

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TERAPIA COM OZÔNIO NO CONTROLE DE LESÕES
CEREBRAIS EM RATOS NEONATOS COM HIDROCEFALIA
EXPERIMENTAL**

Laryssa Petrocini Rosseto

Médica Veterinária

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TERAPIA COM OZÔNIO NO CONTROLE DE LESÕES
CEREBRAIS EM RATOS NEONATOS COM HIDROCEFALIA
EXPERIMENTAL**

Discente: Laryssa Petrocini Rosseto

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientadora: Prof. Dra. Luiza da Silva Lopes

Tese apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Doutora em Medicina Veterinária (Cirurgia Veterinária)

2020

R829t Rosseto, Laryssa Petrocini
Terapia com ozônio no controle de lesões cerebrais em ratos neonatos com hidrocefalia experimental / Laryssa Petrocini Rosseto.
-- Jaboticabal, 2020
64 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes
Coorientadora: Luiza da Silva Lopes

1. Estresse oxidativo. 2. Ozônio. 3. Astrócitos. 4. Isquemia cerebral.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

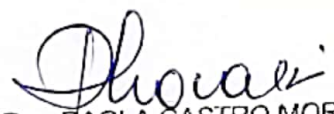
Essa ficha não pode ser modificada.

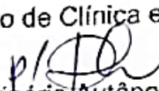
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

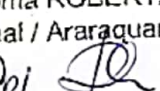
TÍTULO DA TESE: TERAPIA COM OZÔNIO NO CONTROLE DE LESÕES CEREBRAIS EM RATOS
NEONATOS COM HIDROCEFALIA EXPERIMENTAL

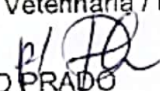
AUTORA: LARYSSA PETROCINI ROSSETO
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES
COORIENTADORA: LUIZA DA SILVA LOPES

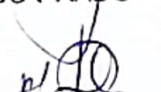
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal


Médica Veterinária Autônoma ROBERTA CARVALHO BASILE
Área de Reabilitação Animal / Araraquara/SP


(VIDEOCONFERÊNCIA)
Profa. Dra. ANELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


(VIDEOCONFERÊNCIA)
Dr. CÉSAR VINÍCIUS GIL BRAZ DO PRADO
Depto. de Cirurgia / FMVZ - USP


(VIDEOCONFERÊNCIA)
Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Laryssa Petrocini Rosseto, filha de Marcos Rosseto e Maristela Petrocini Brizante Rosseto, nasceu em Morro Agudo – SP, no dia 21 de dezembro de 1984. É médica veterinária graduada pelo Centro Universitário Barão de Mauá- Ribeirão Preto – SP, em dezembro de 2007. Aprimoramento em Clínica Médica e Cirúrgica em Pequenos Animais pelo Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto- SP, em fevereiro de 2010. É pós-graduada lato sensu em Fisioterapia Veterinária pelo Instituto Bioethicus, Botucatu-SP em junho de 2010, e pós-graduada lato sensu em Acupuntura Veterinária pelo Instituto Bioethicus, Botucatu–SP em agosto de 2013. Atualmente exerce profissão como médica veterinária especializada em fisioterapia e acupuntura veterinária na FisiPet- Centro de Reabilitação Animal, Ribeirão Preto- SP desde 2010 até dias atuais. Obteve título de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV- Unesp, Jaboticabal em 2016 sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes e é atualmente doutoranda pelo programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV- Unesp, Jaboticabal em 2016 sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes. É atualmente professora convidada em diferentes cursos de pós-graduações em fisioterapia veterinária.

“Todo o conhecimento é uma resposta à uma pergunta”

(G. Bachelard)

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que me apoiaram e incentivaram para a realização deste projeto, em especial aos meus pais Marcos Rosseto e Maristela Petrocini B. Rosseto, e ao meu marido Jalter Roberto da Silva, que pacientemente me auxiliaram e acreditaram na realização deste trabalho.

Dedico também a todos meus pacientes queridos, dos quais me inspiram a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Deixo meu profundo apreço a todos os animais de meu estudo, pois sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir ter condições para esse trabalho.

Agradeço, de uma forma especial, a minha orientadora Profa. Dra. Paola Castro Moraes pela sua amizade, incentivo, orientação profissional.

Aos meus companheiros de experimento Sthefania Covas da Silva, Pamela da Silva Beggiora, e ao colega Gabriel que me auxiliaram e me ensinaram ativamente durante o processo de todo o trabalho.

À minha sócia Manuelle Audino Rodrigues de Sá por sempre me ajudar em nossa clínica.

À Profa. Dra. **Luiza da Silva Lopes por gentilmente me aceitar em seu laboratório de pesquisa, por me ensinar e aceitar a ser minha coorientadora.**

À Sandra Lúcia B. P. Martins, que pacientemente me ensinou sobre técnicas laboratoriais e histológicas.

Aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) e ao setor de cirurgia experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP-SP, em especial a Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes por gentilmente se ceder espaço para execução deste projeto.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Neuroanatomia.....	03
2.2 Hidrocefalia.....	06
2.3 Ozonioterapia.....	08
2.4 Hidrocefalia experimental.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Animais.....	12
3.2 Formação dos grupos experimentais.....	12
3.3 Indução da hidrocefalia.....	13
3.4 Ozonioterapia.....	14
3.5 Estudo por imagem por ultrassonografia de crânio.....	15
3.6 Avaliação comportamental pelo teste de campo aberto (<i>Open Field</i>).....	15
3.7 Perfusão cerebral e dissecação de estruturas.....	17
3.8 Histologia e imuno-histoquímica.....	20
3.9 Documentação fotográfica.....	21
3.10 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Indução dos animais hidrocefálicos.....	22
4.2 Avaliação clínica e ultrassonográfica dos animais.....	22
4.3 Tratamento com ozonioterapia.....	25
4.4 Análise comportamental pelo teste de campo aberto (<i>Open Field</i>).....	25
4.5 Avaliação histológica e imunoistoquímica.....	27
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	42

7. REFERÊNCIAS.....	43
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Eficácia da terapia com ozônio no controle de lesões cerebrais em ratos neonatos com hidrocefalia experimental*", registrado com o número **143/2019**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 26 de agosto de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 ratos Wistar-OLD machos pesando 20g e 05 ratos Wistar-OLD fêmeas pesando 400g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 26/08/2019 a 10/12/2020.

We certify that the Protocol *nº 143/2019*, entitled "*Efficacy of ozone therapy in the control of brain lesions in neonatal rats with experimental hydrocephalus*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *08/26/2019*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 male Wistar-OLD rats weighing 20g and 05 female Wistar-OLD rats weighing 400g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School. This certificate is valid until 12/10/2020.

Ribeirão Preto, 26 de agosto de 2019

Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP

TERAPIA COM OZÔNIO NO CONTROLE DE LESÕES CEREBRAIS EM RATOS NEONATOS COM HIDROCEFALIA EXPERIMENTAL.

Resumo- Hidrocefalia é uma doença neurológica comum em neonatos e que está associada à destruição de axônios periventriculares decorrente de processos isquêmicos, oxidativos e inflamatórios consequentes à dilatação ventricular. Nos casos onde a derivação líquórica é inviabilizada, tratamentos conservativos são usados como terapia neuroprotetora. A terapia com ozônio (O_3) tem sido associada a efeitos neuroprotetores por controlar processos oxidativos, inflamatórios e degenerativos em lesões isquêmicas ou associadas à idade. O objetivo deste estudo foi investigar, os efeitos da ozonioterapia no comportamento, desenvolvimento motor e astrogliose reativa em encéfalos de ratos jovens com hidrocefalia. Trinta e dois ratos foram separados aleatoriamente em quatro grupos de oito animais sendo: grupo controle (C); grupo controle + O_3 (CO_3); grupo hidrocefálico não tratado (HNT); grupo hidrocefálico tratado com O_3 (HTO_3). Os animais dos grupos HNT e HTO_3 foram induzidos à hidrocefalia com sete dias de idade por injeção de caulim a 10% na cisterna magna. Com 14 dias de idade, os grupos CO_3 e HTO_3 receberam quatro tratamentos de O_3 medicinal na dose de 0,1mg/kg, na concentração de 5µg/mL via intraperitoneal. Os ratos foram pesados diariamente e expostos a testes de comportamento até o final do experimento. Todos os animais foram submetidos à eutanásia com 28 dias de vida, e seus encéfalos retirados e processados para análise histológica e imunoistoquímica do corpo caloso e matriz germinativa. Ratos do grupo HNT apresentaram pior desempenho em teste de comportamento de campo aberto quando comparados aos ratos C e CO_3 ($P = 0,0202$). Além disso, esses animais apresentaram ganho de peso tardio comparado aos demais grupos. Os animais HTO_3 obtiveram desempenho semelhante ao grupo C nos testes de campo aberto e maior ganho de peso quando comparado ao grupo HNT. Na avaliação histológica convencional observou-se que a hidrocefalia produziu redução da população de células neurais e sinais sugestivos de morte nas células remanescentes nas estruturas encefálicas estudadas, além de evidências de lesões nas fibras nervosas, com sinais de edema e esgarçamento. Após estudo por imunoistoquímica para GFAP, foi observado também que a hidrocefalia causou reação astrocitária nessas mesmas estruturas. Todas as lesões observadas foram atenuadas após o tratamento com administração de O_3 . Esses achados indicam que a ozonioterapia possui potencial ação neuroprotetora mediada em parte, pela regulação da reação astrocitária.

Palavras chave

Estresse oxidativo, Dilatação ventricular, Isquemia Encefálica, Ozonioterapia, Astrócitos, Corpo Caloso, Matriz germinativa

OZONE THERAPY IN THE CONTROL OF BRAIN LESIONS IN NEONATAL RATS WITH EXPERIMENTAL HYDROCEPHALUS

Abstract: Hydrocephalus is a common neurological disease in neonates and is associated with the destruction of periventricular axons due to ischemic, oxidative and inflammatory processes resulting from ventricular dilation. In cases where the ventricular shunt is not viable, conservative treatments are used as would be neuroprotective. Ozone therapy (O_3) has been associated with neuroprotective effects by controlling oxidative, inflammatory and degenerative processes in ischemic or age-related injuries. The objective of this study was to investigate, the effects of ozone therapy on behavior, motor development and reactive astrogliosis in young rats with hydrocephalus. Thirty-two rats were randomly divided into four groups of eight animals: control group (C); control group + O_3 (CO_3); untreated hydrocephalic group (HNT); hydrocephalic group treated with O_3 (HTO_3). The animals of the groups HNT and HTO_3 were induced to hydrocephalus at seven days of age by injection of 10% kaolin in the cisterna magna. At 14 days of age, the CO_3 and HTO_3 groups received four treatments of medicinal O_3 at a dose of 0.1mg / kg, at a concentration of 5 μ g / mL intraperitoneally. The rats were weighed daily and exposed to behavioral tests until the end of the experiment. All animals were euthanized at 28 days of age, and their brains removed and processed for histological and immunohistochemical analysis of the corpus callosum and germinal matrix. Rats from the HNT group showed worse performance in the open field behavior test when compared to C and CO_3 rats ($P = 0.0202$). In addition, these animals showed late weight gain compared to the other groups. The HTO_3 animals obtained similar performance to group C in the open field tests and greater weight gain when compared to the HNT group. In the conventional histological evaluation, it was noted that hydrocephalus produced a reduction in the cell population and signs suggestive of death in the remaining cells in the brain structures studied, in addition to evidence of damage to nerve fibers, with signs of edema and fraying. After immunohistochemistry study for GFAP, it was also observed that hydrocephalus caused an astrocytic reaction in these same structures. All lesions observed were alleviated after treatment with O_3 administration. These findings indicate that ozone therapy may have a potential neuroprotective action mediated in part by regulation of the astrocytic reaction.

Key words

Oxidative stress, Ventricular enlargement, Brain ischemia, Ozone therapy, Astrocytes, Corpus Callosum, Germinal matrix

LISTA DE ABREVIATURAS

ARE:	Elemento de resposta oxidante
ATP:	Adenosina trifosfato
BSA:	Bovine Serum Albumin
C:	Grupo controle
CAT:	Catalase
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₃ :	Grupo ozônio
CONCEA:	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2:	Clico-oxigenase-2
DAB- 3,3':	Diaminabenzidina
ELISA:	Enzyme linked immunosorbent assay
EM:	Esclerose múltipla
FMRP:	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GFAP:	Glial Fibrillary Acidic Protein
GSH:	Glutathione reduzida
GSH-Px:	Glutathione peroxidase
H.E.:	Hematoxilina-eosina
HNT:	Grupo hidrocefálico não tratado
HSP-70:	Proteína do choque térmico 70
HTO ₃ :	Grupo hidrocefálico tratado com ozônio
IL-1 β :	Interleucinas 1 beta
iNOS:	Oxido nítrico sintase
IP:	Intra peritoneal
LCR:	Líquido cefalorraquidiano
LOPs:	Peroxidação lipídica
MDA:	Malondialdeído
MHz:	Mega hertz
NF- $\kappa\beta$:	Fator Nuclear Kappa-Beta
NOS-2:	Oxido nítrico sintase-2
Nrf-2:	Fator Nuclear Relacionado ao Eritróide 2

O₃: Ozônio

P0: Dia da indução da hidrocefalia

P11: Décimo primeiro dia pós indução

P12: Décimo segundo dia pós indução

P14: Décimo quarto dia pós indução

P15: Décimo quinto dia pós indução

P18: Décimo oitavo dia pós indução

P19: Décimo nono dia pós indução

P21: Vigésimo primeiro dia pós indução

P7: Sétimo dia pós indução

P8: Oitavo dia pós indução

PBS: Phosphate buffered saline

PIC: Pressão intracraniana

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SNC: Sistema nervoso central

SOD: Superóxido dismutase

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

1. INTRODUÇÃO

As afecções do sistema nervoso central (SNC) são constante desafio para a medicina humana e veterinária, em função da fisiopatologia de múltiplas doenças ainda ser pouco elucidada. Quando as disfunções ocorrem nos encéfalos em desenvolvimento, as consequências são piores, resultando frequentemente em transtornos mentais, emocionais e físicos irreversíveis ou até fatais. Das doenças do SNC que afetam as células precursoras do epêndima e dos plexos coroides, a hidrocefalia se destaca como a mais comum tanto na medicina humana como veterinária.

A hidrocefalia é definida como o acúmulo excessivo de líquido cefalorraquidiano (LCR) no sistema ventricular, ocasionando a formação de edemas, estase, isquemia e processos degenerativos no tecido cerebral em decorrência ao aumento da pressão intracraniana (PIC) (Nigri et al., 2016; Donnelly et al., 2018). Até o presente momento, não existe cura definitiva para hidrocefalia. Diferentes técnicas cirúrgicas são empregadas na tentativa de controlar a PIC. Contudo, recém-nascidos podem apresentar complicações cirúrgicas ou instabilidade clínica que postergam a intervenção cirúrgica (Di Curzio et al., 2014).

Com o objetivo de minimizar os danos nos encéfalos em desenvolvimento, protocolos terapêuticos neuroprotecionistas são aplicados na tentativa de amenizar os sintomas e sinais clínicos da hidrocefalia. A neuroproteção é a terapia clínica mais estudada, apresentando resultados promissores nos quadros em que a cirurgia precisa ser adiada (Del Bigio e Di Curzio, 2016; Da Silva et al., 2018). Encéfalos de neonatos hidrocefálicos estão sujeitos a processos oxidativos, inflamatórios e isquêmicos da doença, e novos métodos de tratamento como a ozonioterapia são estudados como opção de recurso terapêutico para processos neurodegenerativos (Resitoglu et al., 2018).

O ozônio (O₃) é um gás altamente instável, capaz de atuar de diversas maneiras no organismo. Uma das vias mais estudadas na atualidade é a modulação da capacidade oxidativa do organismo por meio da ativação do fator nuclear-relacionado ao eritróide 2 (Nrf2), responsável por regular a expressão de proteínas

antioxidantes e controlar processos inflamatórios e imunológicos (Cuadrado, 2016). No entanto, até o momento da finalização desta pesquisa, não foi encontrada nenhuma citação do uso da ozonioterapia no tratamento da hidrocefalia, evidenciando a relevância científica do presente estudo.

É conhecido que uma parcela dos pacientes hidrocefálicos não pode ser submetida ao tratamento cirúrgico imediatamente após o diagnóstico, por apresentar condições clínicas desfavoráveis para o procedimento. Além disso, o retardo no tratamento e controle da hidrocefalia, especialmente em recém-nascidos, pode não permitir a recuperação total mesmo após a intervenção cirúrgica. Conhecendo os possíveis efeitos neuroprotetores da ozonioterapia e compreendendo os processos degenerativos, isquêmicos e oxidativos presentes na fisiopatogenia da hidrocefalia, espera-se que a ozonioterapia possa otimizar os processos neuroregenerativos, antioxidativos e neurovasculares, melhorando a qualidade de vida de animais e pacientes humanos.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuroanatomia

O sistema ventricular encefálico é composto por câmaras preenchidas por líquido cefalorraquidiano (LCR) localizadas no interior do encéfalo e revestidas por epêndima. O sistema ventricular é dividido em ventrículos laterais, terceiro ventrículo, aqueduto mesencefálico e quarto ventrículo (Figura 1). Os ventrículos laterais estão localizados no telencéfalo, sendo um a direita (primeiro ventrículo) e outro à esquerda (segundo ventrículo) e são separados pelo septo pelúcido que se estende do corpo caloso ao fórnix. Os ventrículos laterais são subdivididos em corno rostral, corpo e corno temporal. A parte central ou corpo do ventrículo lateral comunica-se medialmente com o terceiro ventrículo, pelo forame interventricular. O corno rostral comunica-se com a cavidade do bulbo olfatório referente ao mesmo hemisfério. O corno temporal acompanha o núcleo caudado, adquirindo um formato de “C” característico do ventrículo lateral. No assoalho do ventrículo lateral é formado pelo núcleo caudado, fornix, fimbria do hipocampo e hipocampo. O limite rostral e o teto mantem contato com o corpo caloso. O terceiro ventrículo é ímpar e mediano, e está localizado no diencéfalo. Comunica-se dorsalmente com o ventrículo lateral correspondente pelo forame interventricular. No limite rostral do terceiro ventrículo encontra-se a lâmina terminal cinzenta, enquanto que o assoalho é formado pelo quiasma óptico, infundíbulo da hipófise, corpo mamilar e túber cinéreo. O limite caudal da cavidade é disposto pela glândula pineal, comissura caudal e aqueduto mesencefálico, que por sua vez, comunica o terceiro com o quarto ventrículo. O aqueduto mesencefálico é um conduto estreito localizado medianamente entre o teto do mesencéfalo e o tegmento mesencefálico. O quarto ventrículo está localizado na cavidade rombencefálica, no nível da ponte e a porção rostral do bulbo e comunicando-se caudalmente com o canal central da medula (Prada, 2014).

O corpo caloso é uma estrutura composta de fibras nervosas orientadas transversalmente, sendo dividida em quatro partes: rostro (porção anterior), joelho, esplênio (porção posterior) e corpo (região entre joelho e esplênio) (Figura 2). A

função do corpo caloso é de estabelecer ligação entre os hemisférios cerebrais (Zicarelli et al, 2014).

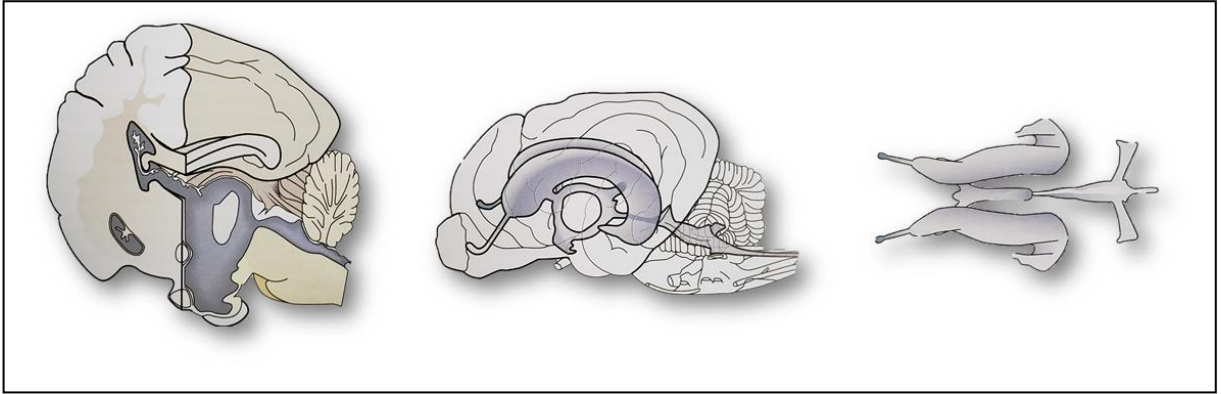


Figura 1: Imagem esquemática referente a anatomia do sistema ventricular normal de um cão (Dewey e da Costa, 2017).

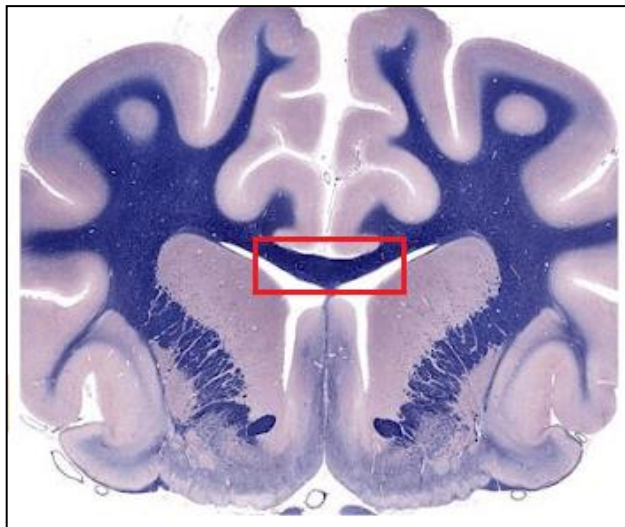


Figura 2: Encéfalo de canino em corte transversal imediatamente rostral ao quiasma óptico, identificando-se a posição do corpo caloso (retângulo vermelho). Lâmina corada em Luxol. (Universidade de Minnesota- <https://vetpath.wordpress.com/2010/10/20/link-highlights-canine-brain-transections/>).

O tecido cerebral de neonatos é formado por estruturas relativamente frágeis como a matriz germinativa. A matriz germinativa é uma estrutura com alta densidade celular e vascular e está localizada abaixo da região germinativa endimária no cérebro (Figura 3). Esta estrutura é responsável pela proliferação e diferenciação de neuroblastos e glioblastos que migram para o córtex cerebral ao longo do desenvolvimento encefálico fetal (Luo et al., 2018). A medida que o encéfalo amadurece e se desenvolve, a matriz germinativa sofre uma redução progressiva no tamanho até a completa involução (Ballabh et al., 2004).

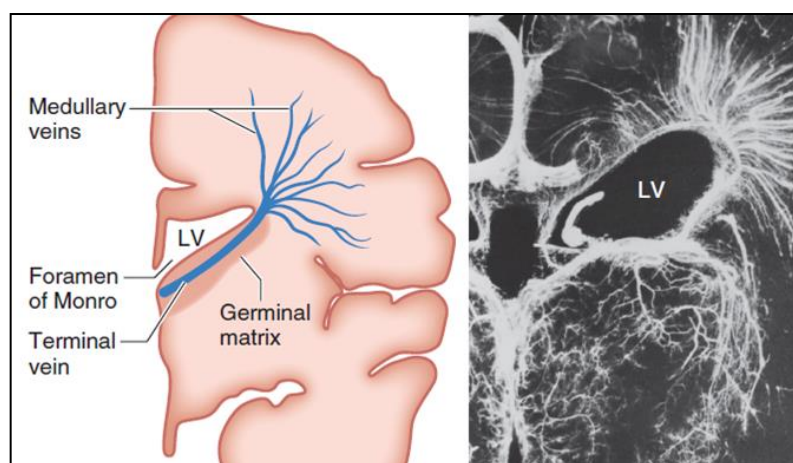


Figura 3: A) Diagrama esquemático demonstrando veias medulares, dispostas em uma distribuição em formato de leque, que drenam o sangue da substância branca cerebral para a veia terminal até a matriz germinativa. B) Venograma post-mortem obtido de um recém-nascido humano mostra a aparência real dos vasos (Inder et al., 2018).

Dentre as células do SNC, os astrócitos são as células mais abundantes e estudadas no sistema nervoso central. Os astrócitos são células complexas e que estão presentes em todo SNC. São responsáveis por inúmeras funções essenciais para o desempenho normal do SNC. Suas ações incluem regulação do fluxo sanguíneo local, fornecimento de metabólitos energéticos aos neurônios, participação na função sináptica e neuroplasticidade e manutenção do equilíbrio de

neurotransmissores, íons e fluídos intra e extracelular (Pekny e Nilsson, 2005). Ao mesmo tempo, os astrócitos são capazes de responder a várias formas de insultos no SNC, como trauma, isquemia e lesões neurodegenerativas. Essa resposta é conhecida por astrogliose reativa e envolve mudanças progressivas na expressão gênica e morfológica do astrócitos. Em casos graves, a reação astrocitária pode resultar na formação de cicatrizes gliais, inibindo a regeneração do axônio (Sofroniew et al., 2009).

2.2 Hidrocefalia

Por definição, a hidrocefalia é o acúmulo excessivo de LCR no sistema ventricular do cérebro em resposta ao desbalanço entre a produção e absorção LCR. O aumento de volume progressivo acarreta no aumento da pressão intracraniana (PIC), provocando estiramento e compressão do tecido nervoso, deformação dos vasos cerebrais e comprometimento do fluxo sanguíneo encefálico (Nigri et al., 2016). Como resultado, é possível observar a formação de edemas, estase, isquemia e processos degenerativos no tecido cerebral (Donnelly et al., 2018).

Estima-se que 60% do LCR seja formado principalmente por uma estrutura localizada no interior dos ventrículos cerebrais, denominada plexo coroide, enquanto os 40% restantes do volume total sejam derivados de células endoteliais presentes nos ventrículos e capilares do parênquima. A produção líquórica é decorrente da combinação de processos que ocorrem no interior dos ventrículos laterais e no 3º e no 4º ventrículo. A absorção do LCR é feita pelas vilosidades aracnoides, distribuindo-se pela corrente sanguínea venosa (David, 2003; Oshio et al., 2005). A hidrocefalia pode ser em decorrência das anormalidades na secreção, circulação e reabsorção do LCR, com mecanismos subjacentes a esses déficits não totalmente elucidados. Em animais, o desequilíbrio entre a produção e absorção do LCR no SNC está relacionado aos traumas cranianos, neoplasias encefálicas, infecções virais no feto em desenvolvimento e partos distócicos. Em cães a predisposição genética é fator importante para desenvolvimento de hidrocefalia (Albuquerque et al., 2008; Zachari e McGavin, 2013).

Não há cura definitiva e, na maioria dos pacientes com hidrocefalia, a técnica de tratamento empregada é a cirurgia de derivação liquórica (*shunt*). Complicações cirúrgicas são frequentes, em especial quando realizada em crianças recém-nascidas. Obstrução das válvulas e infecções estão entre as complicações mais comuns que aumentam a morbidade e a mortalidade. No entanto, instabilidades clínicas do paciente podem postergar a intervenção cirúrgica. O tratamento tardio e o aumento progressivo dos ventrículos podem resultar em danos cerebrais relevantes, especialmente em encéfalos em desenvolvimento (Di Curzio et al., 2014).

Evidentemente, a ausência de intervenção clínica acentua os sinais e sintomas do paciente pelo constante aumento da pressão intracraniana e dano das estruturas como axônios, epêndima, núcleos da base, córtex cerebral, tálamo e cerebelo. Tais lesões no tecido encefálico geram atividade astrocitária aumentada, originando cicatriz glial no local do tecido neural degenerado (Xu et al., 2015; Mishra et al., 2016). O aumento da PIC pode ocasionar compressão dos hemisférios cerebrais gerando fluxo sanguíneo inadequado, alteração da atividade elétrica neural e mudanças do metabolismo local (Donnelly et al., 2018). É relevante lembrar que, as lesões progressivas no encéfalo de pacientes hidrocefálicos, podem resultar em sequelas permanentes mesmo após o controle da PIC (Del Bigio e Di Curzio, 2016). A manutenção da vida e o tratamento das sequelas da hidrocefalia demandam alto custo na saúde pública, necessitando de novos tratamentos menos onerosos e mais eficientes para o tratamento da hidrocefalia (Oton de Lima, 2014).

Além da queda do aporte de substratos e de oxigênio no tecido, existe a formação de radicais livres que prejudicam o metabolismo energético da célula, e geram exocitotoxicidade (Clavo et al., 2011; Toklu et al., 2017). Mesmo após a reperfusão de sangue na área isquêmica, novos radicais livres são produzidos. Em estudo realizado por Socci et al (1999) foi verificado que em cérebros de ratos adultos com hidrocefalia congênita, a análise imunoistoquímica revelou redução da enzima superóxido dismutase (SOD) responsável pelo metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no epêndima, plexo coroide e hipocampo. O estresse oxidativo excessivo promove depleção rápida dos estoques antioxidantes

endógenos, que somado à peroxidação lipídica da membrana e à oxidação de proteínas, ocasiona apoptose ou necrose celular (Toklu et al., 2017). Neonatos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo excessivo, visto que possuem baixa defesa antioxidante e capacidade limitada para inibir a peroxidação lipídica (Socci et al., 1999).

Em situações nas quais a intervenção cirúrgica para correção e estabilização da hidrocefalia não pode ser aplicada, são indicados tratamentos neuroprotecionistas no intuito de aliviar os sinais e sintomas clínicos até a derivação líquórica ser realizada (Reddy et al., 2014). Atualmente existem três principais linhas de tratamentos neuroprotetores explorados na pesquisa, que incluem a redução da produção de LCR, redução dos processos inflamatórios e fibróticos decorrentes de hemorragias cerebral ou meningite, e a neuroproteção após o desenvolvimento da ventriculomegalia (Del Bigio e Di Curzio, 2016). A neuroproteção é atualmente a mais pesquisada por meio de fármacos ou técnicas extracorpóreas para tratamento complementar à hidrocefalia. Terapias endógenas com antioxidantes, anti-inflamatórios, melatonina, ou exógenas como terapia hiperbárica, acupuntura e enriquecimento ambiental se mostraram promissores no controle de processos degenerativos cerebrais (Di Curzio et al., 2014; Del Bigio e Di Curzio, 2016; Catalão et al., 2017; Da Silva et al., 2018; Tida et al., 2018; Turgut et al., 2018).

Isto posto, a contenção do processo oxidativo, inflamatório e isquêmico são importantes para controle neurodegenerativo da doença, e como tal, novos métodos de tratamento como a ozonioterapia, são estudados como opção de recurso terapêutico para processos neurodegenerativos (Resitoglu et al., 2018). A ozonioterapia tem demonstrado resultados promissores em trabalhos semelhantes com isquemia, hipometabolismo e doenças degenerativas como esclerose múltipla, Parkinson e Alzheimer (Clavo et al., 2011; Delgado-Roche et al., 2017; Molinari et al., 2017; Elkholy e Al-Gholam, 2018; Resitoglu et al., 2018).

2.3 Ozonioterapia

O ozônio (O_3) é um gás cíclico, altamente instável, composto de três átomos de oxigênio. Atualmente, o ozônio é estudado como terapia médica apresentando

resultados relevantes no controle de diversas condições, como lesões isquêmicas, doenças vasculares, degenerativas e imunomediada, além de ser eficaz como agente antibacteriano, antiviral e antifúngico (Molinari et al., 2017; Braidly et al., 2018; Resitoglu et al., 2018). Estudos realizados com animais, o ozônio demonstrou efeito anti-inflamatório, proteção contra danos por reperfusão e de inibição de apoptose em lesões isquêmicas induzidas experimentalmente em diferentes órgãos (Frosini et al., 2012; Azuma et al., 2014; Molirani et al., 2017).

A ozonioterapia atua de diversas maneiras no organismo. Uma das vias de ação mais estudadas atualmente é a indução controlada de estresse oxidativo transitório, que posteriormente resultará no aumento da capacidade antioxidante do organismo (Bocci et al., 2011). O ozônio é capaz de ativar o fator nuclear-relacionado ao eritróide 2 (Nrf2), um fator de transcrição nuclear presente no citoplasma celular. Essa proteína básica de leucina é capaz de regular a expressão de proteínas antioxidantes, favorecendo a proteção celular contra os danos oxidativos desencadeados por doenças inflamatórias crônicas (Cuadrado, 2016).

Consequentemente, o Nrf2 é capaz de induzir a síntese de diferentes enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), proteína de choque térmico 70 (HSP70) dentre outras. Atualmente, é de conhecimento que o aumento da capacidade antioxidante do organismo é etapa crucial para neutralizar a inflamação crônica típica de doenças agravadas pelo estresse oxidativo crônico (Frosini et al, 2012; Bocci et al., 2015).

Sagai e Bocci (2011) sugerem que o ozônio possua ação neuroprotetora baseada nos efeitos biológicos observados *in vivo*. Segundo os autores, o estresse oxidativo está presente na maioria da fisiopatogenia das doenças neurológicas. A morte celular neural está relacionada ao aumento expressivo de radicais livres durante a patogênese de doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (Sagai e Bocci, 2011; Delgado-Roche et al., 2017; El-Mehi e Faried, 2019). O aumento substancial de ROS no tecido neural resulta na neuroinflamação e disfunção mitocondrial ocasionando a apoptose e morte de células neuronais. Acredita-se que a ativação da via Nrf2 seja a peça principal para combater os efeitos deletérios induzidos pelos ROS. A ativação do Nrf2 resulta no

estímulo de uma bateria de genes citoprotetores responsáveis pela produção de enzimas antioxidantes e antiinflamatórios (Sagai e Bocci, 2011; Bocci et al., 2015).

Delgado Roche et al. (2017) avaliaram a resposta neuroprotetora e oxiredução celular da ozonioterapia em pacientes humanos com esclerose múltipla (EM). Os pacientes tratados com ozônio medicinal apresentaram melhora significativa na atividade de enzimas antioxidantes, redução do dano oxidativo em lipídios e proteínas e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas-1 β (IL-1 β) e aumento na fosforilação de Nrf2 em células mononucleares de pacientes com EM. Fronisi et al. (2012) relataram que a ozonioterapia exerceu efeito neuroprotetor em ratos induzidos a isquemia cerebral. Os autores sugeriram que a capacidade neuroprotetora decorreu pela melhora da liberação e entrega de oxigênio e glicose, e pelo aumento e regulação na produção de enzimas antioxidantes intracelulares.

2.4 Hidrocefalia experimental

A injeção intracisternal de caulim é um dos métodos mais fidedignos para a produção de hidrocefalia experimental. O caulim é um produto composto de silicato hidratado de alumínio, barato e de fácil acesso. É eficiente no bloqueio da circulação líquórica, sem a necessidade de cirurgias associadas que possam produzir distorções do tecido nervoso que não aquelas resultantes exclusivamente da hidrocefalia. Quando injetado na cisterna magna, inicia um processo inflamatório agudo nas meninges, originando obstrução na saída do quarto ventrículo, sem provocar lesões primárias ao parênquima cerebral (Dixon et al., 1932; Defeo et al., 1979).

Partindo deste princípio, qual melhor abordagem conservativa para minimizar o impacto da hidrocefalia nestes pacientes? É de conhecimento que processos degenerativos, isquêmicos e oxidativos estão presentes na fisiopatologia da hidrocefalia, e tratamentos como a ozonioterapia podem auxiliar a minimizar os prejuízos nas estruturas afetadas pelo aumento da produção líquórica, por meio da resposta neuroprotetora antioxidativa e vascular dos tecidos neurais (Clavo et al., 2011; Molinari et al., 2017; Delgado-Roche et al., 2017; Resitoglu et al., 2018).

Assim sendo, pesquisas científicas nesse âmbito possuem extrema relevância científica, uma vez que a ozonioterapia surge como nova modalidade terapêutica de baixo custo e pouco explorada quanto aos seus efeitos neuroprotetores, em especial na hidrocefalia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos neste trabalho envolvendo animais, foram realizados conforme as diretrizes estabelecidas Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, (Protocolo CEUA nº 143/2019). Foram tomadas medidas a fim de minimizar o sofrimento e a quantidade de animais usados nesta pesquisa.

3.1 Animais

Os animais foram oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto, em número suficiente para composição dos grupos experimentais. Foram utilizadas ninhadas de ratos machos da linhagem Wistar Hannover, com sete dias de vida, cuja ninhada foi constituída pela rata-mãe e oito filhotes. Os animais foram transportados no dia do nascimento, para o Biotério da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Durante a permanência dos animais no Biotério, foi oferecida dieta padrão para roedores de laboratório e água à vontade às mães. Os filhotes em fase de desmame também receberam acesso à dieta e à água.

3.2 Formação dos grupos experimentais

Foram formados 4 grupos experimentais, com 8 animais em cada grupo, totalizando 32 indivíduos. Os animais foram distribuídos em:

- Grupo Controle (C): nenhuma intervenção com ozônio ou hidrocefalia foi realizada neste grupo, sendo submetidos à eutanásia com 28 dias de vida (P21) (n = 8).
- Grupo Controle tratado com ozonioterapia (CO₃): A partir do 14º dia de vida, os ratos receberam tratamento com ozonioterapia nos dias 14, 18, 22 e 26 dias de vida (P7, P11, P15 e P19 respectivamente), na dose 0,1mg/kg via intraperitoneal (IP) na concentração de 5 µg/mL. Os ratos foram submetidos à eutanásia com 28 dias de vida (P21) (n = 8).

- Grupo Hidrocefálico (HNT): os ratos foram induzidos à hidrocefalia com sete dias de vida (P0) e submetidos à eutanásia com 28 dias de vida (P21) (n = 8).
- Grupo Hidrocefálico Tratado (HTO₃): Os ratos foram induzidos à hidrocefalia com sete dias de vida (P0) e receberam tratamento com ozonioterapia, dose 0,1mg/kg via intraperitoneal (IP) na concentração de 5 µg/mL nos dias 14, 18, 22 e 26 dias de vida (P7, P11, P15 e P19 respectivamente). A eutanásia destes animais foi realizada com 28 dias de vida (P21) (n=8).

Todos os animais foram observados diariamente quanto a possíveis alterações clínicas como perda de peso e desidratação, alterações da marcha e da consciência, negligência com a higiene, entre outras.

Observação: A caixa-alojamento foi constituída por ratos controles e hidrocefálicos pertencentes da mesma ninhada, respeitando o número de nove ratos/caixa (oito ratos filhotes e rata mãe). A rata mãe foi mantida junto aos filhotes até o termino do experimento em função do período de amamentação e garantia de conforto e bem-estar dos ratos neonatos. Os ratos foram marcados com pequenas perfurações nas orelhas para identificação dos grupos pertencentes. As caixas de animais que foram submetidos à terapia com ozônio também contiveram tanto animais hidrocefálicos quanto ratos controles.

3.3 Indução da hidrocefalia

Os filhotes com sete dias de idade foram escolhidos aleatoriamente dentro de cada ninhada para inclusão em um dos grupos experimentais. Os ratos dos grupos controles foram submetidos à anestesia, porém sem nenhuma intervenção. O método de indução da hidrocefalia consistiu na aplicação intracisternal de caulim, com os animais sob anestesia inalatória com isofluorano, baseado em estudo experimental de Lopes et al. (2009) e da Silva et al. (2018). Cada animal foi posicionado por um auxiliar, com o crânio em ventroflexão, expondo a região cervical dorsal. Após palpação do espaço entre a margem posterior do forame magno, no osso occipital, e a borda cranial do arco dorsal da primeira vértebra cervical, uma agulha odontológica Mise 0,3, de bisel curto, conectada a uma seringa, era introduzida até a perfuração da dura-máter. Após a punção suboccipital, foi

injetado, por injeção percutânea lenta, 0,04mL de uma suspensão de caulim (Merck®) ¹a 10% em água destilada, esterilizada em autoclave (Figura 4) (da Silva et al., 2018). Posteriormente à injeção intracisternal, os filhotes foram observados até completa recuperação e então recolocados em suas caixas de alojamento de origem, retornando ao Biotério.

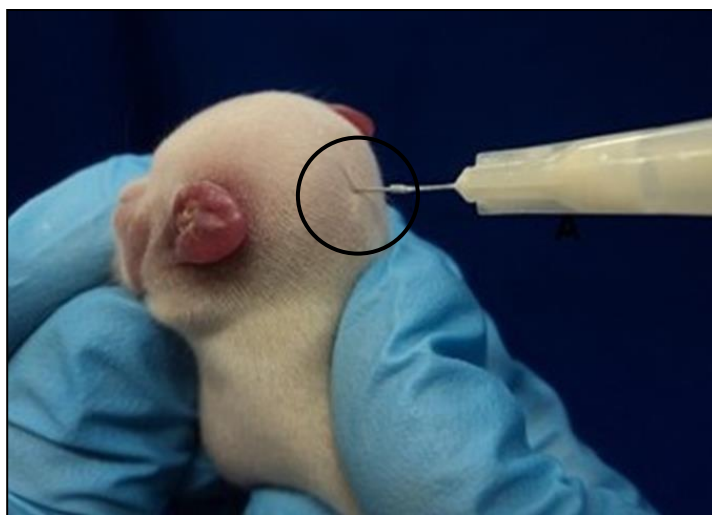


Figura 4: Indução da hidrocefalia em ratos da linhagem Wistar Hannover. Aplicação percutânea na cisterna magna de Caulim (Merck®) a 10% (área circulada). (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

3.4 Ozonioterapia

Para o tratamento dos animais com gás ozônio, foi utilizado gerador de ozônio medicinal da marca Ozonic®, modelo Ozonic Vet, com taxa de fluxo de ar máxima de 16,6mL/s, e faixa de concentração de 0-90 µg/mL. O aparelho foi previamente calibrado com espectrofotômetro UV de 254nm para garantir concentração exata necessária durante o experimento. O tratamento com ozonioterapia foi realizado em uma sala localizada no setor de cirurgia experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP-SP, mantendo a temperatura interna controlada entre 21 e 23°C. Durante o processo de produção do gás ozônio, o gerador utilizou oxigênio medicinal proveniente de um cilindro de 1L

¹ Caulim (Merck®): Silicato de Alumínio Hidratado

acoplado ao aparelho. O gás ozônio produzido foi coletado diretamente do gerador em seringas resistentes a ozônio e foram imediatamente administrados nos ratos pela via intraperitoneal por meio de agulhas 0,45x13mm.

Os ratos foram contidos por auxiliar manualmente para a aplicação do gás ozônio. Os animais dos grupos CO₃ e HTO₃ receberam o tratamento com ozonioterapia na dose de 0,1mg/kg e na concentração de 5 µg/mL nos dias P7, P11, P15 e 19. Ao final da aplicação de ozonioterapia intraperitoneal, os animais foram observados por aproximadamente 15 minutos para verificar presença de efeitos adversos após o tratamento como vômitos, diarreias e distensão abdominal. A escolha da dosimetria foi baseada de acordo com Comitê Científico Internacional de Ozonioterapia (ISCO3, 2020) e estudos pilotos realizados previamente a este experimento.

A eutanásia foi realizada no 28º dia de vida (P21). Os encéfalos foram coletados para posterior análise histológica e imunoistoquímica.

3.5 Estudos de imagem por ultrassonografia de crânio

Todos animais desta pesquisa foram avaliados por meio da ultrassonografia transcraniana no sétimo dia pós-indução (P7) para diagnosticar a presença de ventriculomegalia nos animais. Para a aquisição de imagens do encéfalo, os ratos foram submetidos à anestesia prévia com isoflurano. Posteriormente, foi empregado para a ultrassonografia de crânio, o equipamento VEVO 2100 (VisualSonics), com transdutor de 30MHz (Laboratório Multiusuário e Ultrassom e Ecocardiografia em Pequenos Animais – FMRP-USP). As imagens obtidas no plano sagital e coronal foram utilizadas para avaliação do tamanho ventricular e espessura cortical.

3.6 Avaliação comportamental pelo teste de Campo Aberto (*Open Field*)

Os animais foram pesados diariamente e seu comportamento na caixa-alojamento foi avaliado de maneira individual (exploração do ambiente, mobilidade no espaço), e coletivamente na interação com os outros membros do grupo.

Para estudo do desenvolvimento sensório-motor, o comportamento deambulatório foi avaliado no dia oito após a injeção de caulim (P8), dia 12 (P12), dia 14 (P14) e dia 18 (P18) pelo teste de campo aberto (*Open Field*) (Figura 5). Cada animal foi observado individualmente em uma arena de acrílico transparente de 60 cm de comprimento e 45 cm de altura no tempo cronometrado de 2 minutos, avaliando cuidados com a higiene, exploração do ambiente e marcha de acordo com a escala: 4 = alerta, com exploração e marcha normal; 3 = discretamente letárgico, com atividade reduzida, mas com marcha normal quando estimulado; 2 = cifótico, consegue caminhar, porém a marcha apresenta base alargada, instável ou atáxica; 1 = mal consegue andar, mas ainda se alimenta; 0 = próximo da morte ou eutanásia (da Silva et al., 2018). Entre as observações de diferentes ninhadas de animais, a arena era limpa com sabão neutro diluído em água.

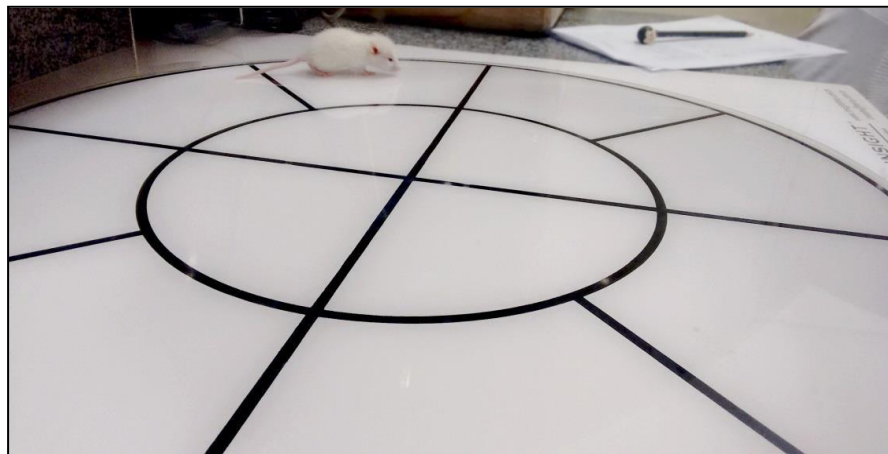


Figura 5: Teste de *Open Field*. Rato da linhagem Wistar Hannover hidrocefálico explorando o ambiente no interior da arena de acrílico, sendo observado pelo pesquisador por um período de dois minutos (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

O plano experimental foi exemplificado na linha cronológica na Figura 6:

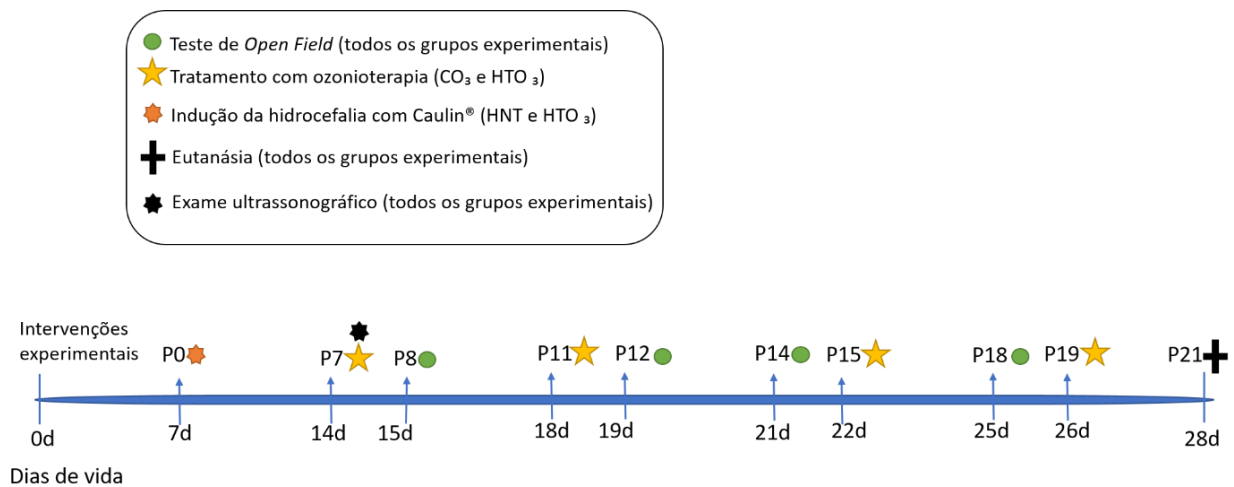


Figura 6: Linha cronológica dos fatos relevantes experimentais executados durante experimento em ratos Wistar Hannover para estudo dos potenciais efeitos terapêuticos da ozonioterapia na hidrocefalia experimental.

3.7 Perfusão cerebral e dissecação de estruturas

Ao final do experimento, após o 21º dia pós-indução (P21), os animais de cada grupo foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina 10% e xilazina 10% (nas doses de 0,1 e 0,05 mg/100g de peso corporal). Posteriormente, o animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, e foram realizadas incisões amplas no diafragma e lateral no tórax, paralelo em ambos os lados da costela até clavícula, expondo o coração (Figura 7 A). Com o tórax aberto, uma agulha hipodérmica 25 x 0,8mm (21G x 1) foi introduzida na ponta do ventrículo esquerdo e canulada até a raiz da aorta, sendo iniciada a perfusão transcardíaca com solução salina e auxílio de bomba de perfusão peristáltica (Fisher Scientific). Como ponto de saída para o líquido perfundido, foi feita uma pequena incisão na aurícula direita. A perfusão solução salina só foi suspendida quando observado o clareamento do líquido de saída (cerca de 1 mL/g de peso do animal) (Figura 7 B). Em seguida, os ratos foram decapitados e seus cérebros retirados em bloco, através de uma craniectomia de vértex (Figura 7 C).

Imediatamente após sua retirada, cada cérebro foi dividido no plano sagital. A metade esquerda foi, então, dissecada e subdividida em quatro porções: manto cortical dorsal ao ventrículo lateral, núcleos da base, hipocampo e tronco encefálico/cerebelo. Cada porção foi acondicionada em tubo tipo *eppendorf* devidamente identificado, mergulhado em nitrogênio líquido para congelamento rápido e armazenada em Ultrafreezer -80°C para estudos futuros. Já as metades direitas dos encéfalos foram subdivididas no plano coronal, em uma porção anterior e outra posterior, tomando-se como referencial o quiasma óptico, depois imersos em uma solução fixadora de paraformaldeído a 3% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3 – 7,4), por 24 horas à temperatura de 4°C, quando foi trocada por uma solução de paraformaldeído 3% fresca, permanecendo nesta solução fixadora por mais sete dias à mesma temperatura.

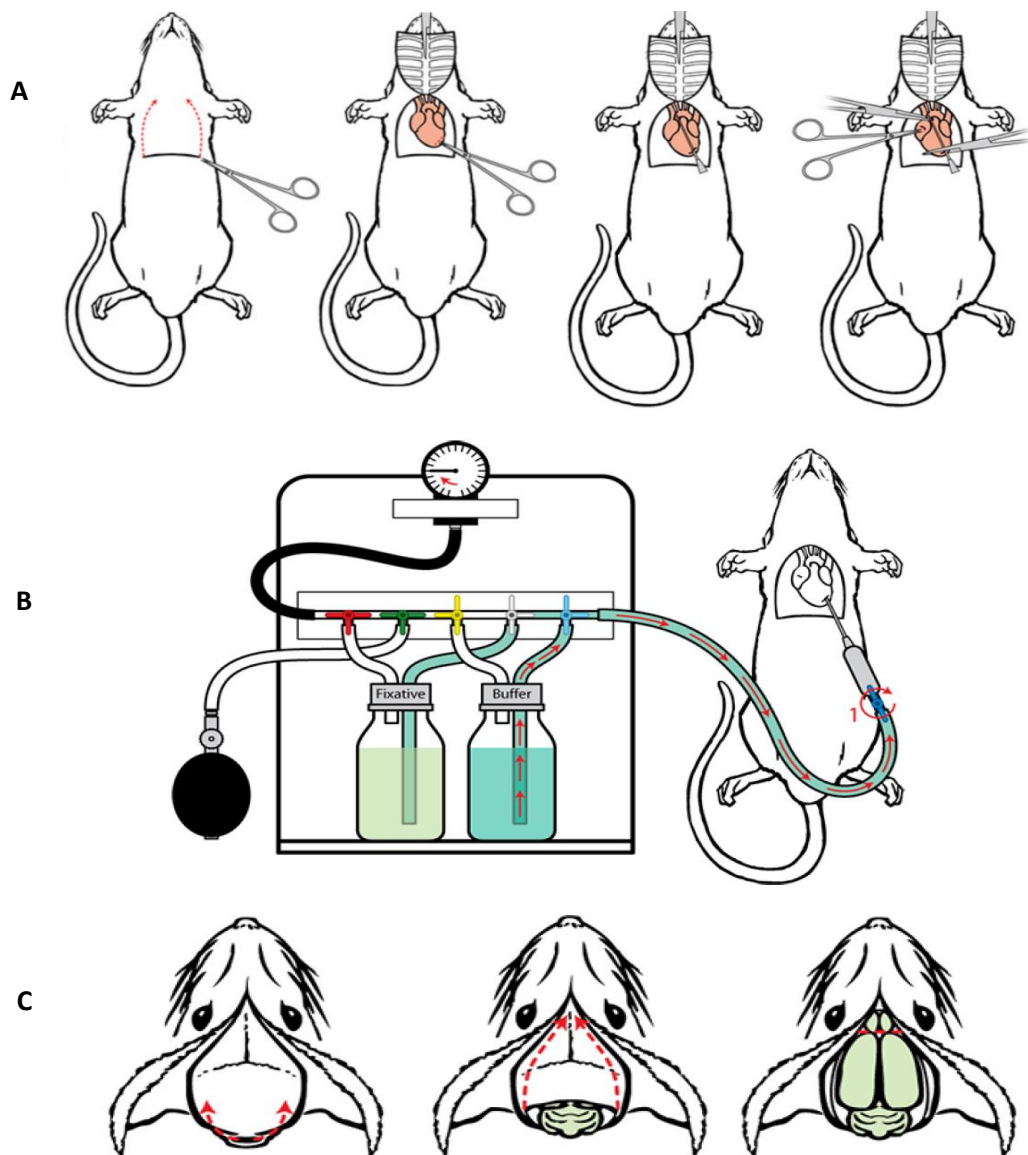


Figura 7: Técnica de perfusão cerebral. A) Com o animal posicionado em decúbito dorsal são realizadas incisões amplas no diafragma e laterais no tórax, para expor o coração. B) Uma agulha é introduzida na extremidade do ventrículo esquerdo e canulada até a raiz da aorta, sendo iniciada a perfusão transcardíaca com solução salina. Um ponto de saída é feito no átrio direito. C) Na craniotomia de vértex a tesoura secciona cuidadosamente ao longo da superfície interna do crânio, para evitar danos ao cérebro. O bulbo olfatório é desprezado e o encefalo retirado (Fonte: Gage et al., 2012).

3.8 Histologia e imunoistoquímica

As lâminas histológicas contendo as secções de amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (50% a 100%) diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina. Foram cortadas em plano coronal em um micrótomo rotativo em secções de 5µm de espessura e os cortes foram estendidos em lâminas histológicas. Para análise por histoquímica, as lâminas foram mantidas em estufa (60°C) por uma hora para derretimento da parafina. A seguir, os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização, seguidos de banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água; posteriormente, foram corados com hematoxilina e eosina (da Silva et al., 2018). Na coloração feita pelo método hematoxilina e eosina, foram observados a citoarquitetura geral, a distribuição das estruturas e a densidade celular nas regiões de corpo caloso e matriz germinativa.

Para o estudo imunoistoquímico do GFAP (“glial fibrillary acidic protein”), as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C, por 30 min, e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. Após recuperação antigênica, quando indicado, pelo método de acidificação e aquecimento (citrato de sódio em panela elétrica), foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em PBS (phosphate buffered saline). Posteriormente foi feito o bloqueio com soro adequado a 10% em PBS, por 30 minutos em câmara úmida. Logo após, os cortes foram incubados “overnight” à temperatura de 4°C com o anticorpo primário anti-GFAP (DAKO Z0334, Dinamarca) em diluições 1,5:3000. Lavado o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho - Santa Cruz Biotechnology SC-2040) diluído 1:300 em BSA (Bovine serum albumin). Após, foram incubados com o conjugado estreptavidina - HRP (BioLegend cat.405210) diluído 1:400 em PBS. A seguir, foram revelados com DAB (3,3’- diaminobenzidina - Sigma).

Por fim, as lâminas foram submetidas à contra coloração com hematoxilina, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcool e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount®. Observação: para a imunoistoquímica, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas sinalizadas ou Starfrost. Foram realizados estudos por imunoistoquímica

para GFAP para avaliação da reação astrocitária, por meio da distribuição e do aspecto morfológico dos astrócitos reativos no corpo caloso e na matriz germinativa.

3.9 Documentação fotográfica

O material foi fotografado para documentação das lâminas e para contagem de células utilizando os microscópios de luz Nikon com sistema de captura digital de imagens, instalado no Laboratório de Proteção Cerebral na Infância do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e AxiosKop2 plus (Carl Zeiss) com câmera digital AxioCam Hrc (Carl Zeiss) acoplados a um computador Pentium II equipado com o software Axio Vision 3.1 do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina, as imagens foram fotografadas no corpo caloso, na sua região imediatamente lateral à linha média, e na matriz germinativa vizinha ao ângulo lateral do ventrículo lateral. Nas lâminas imunomarcadas com GFAP foram fotografados campos demarcados, não sobrepostos, com área mensurada, em toda a extensão do corpo caloso e matriz germinativa (objetiva de 40X), nos quais foi realizada a contagem dos astrócitos reativos de forma manual, com avaliadores sem conhecimento dos grupos, e posteriormente calculada a densidade dos astrócitos. Além disso, foi realizada a classificação da reação astrogliar, aplicando-se um escore de 0 a 2, sendo 0: ausência de astrócitos reativos; 1: astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados e 2: astrócitos reativos com prolongamentos grossos (da Silva et al., 2018).

3.10 Análises estatísticas

Testes paramétricos foram utilizados para comparações de grupos com dados normalmente distribuídos (análise de variância - ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey), enquanto testes não-paramétricos (Kruskall-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn) foram usados para outras comparações. As diferenças estatísticas foram

consideradas significantes quando $p < 0,05$, todos com a utilização do software de estatística GraphPad Prism® versão 6.

4. RESULTADOS

4.1 Indução dos animais hidrocefálicos

A indução da hidrocefalia dos grupos HNT e HTO_3 ocorreu sem nenhuma intercorrência. Todos os ratos induzidos foram observados por 15 minutos após a indução e nenhuma alteração ou sinal clínico foi observado.

4.2 Avaliação clínica e ultrassonográfica dos animais

A hidrocefalia foi confirmada em todos os filhotes dos grupos HNT e HTO_3 , sendo possível visibilizar a dilatação ventricular no corte coronal. Os valores da mensuração do crescimento ventricular variaram entre hidrocefalia moderada à grave nos dois grupos hidrocefálicos. Nos grupos C e CO_3 não foi observada qualquer alteração no tamanho ventricular (Figura 8).

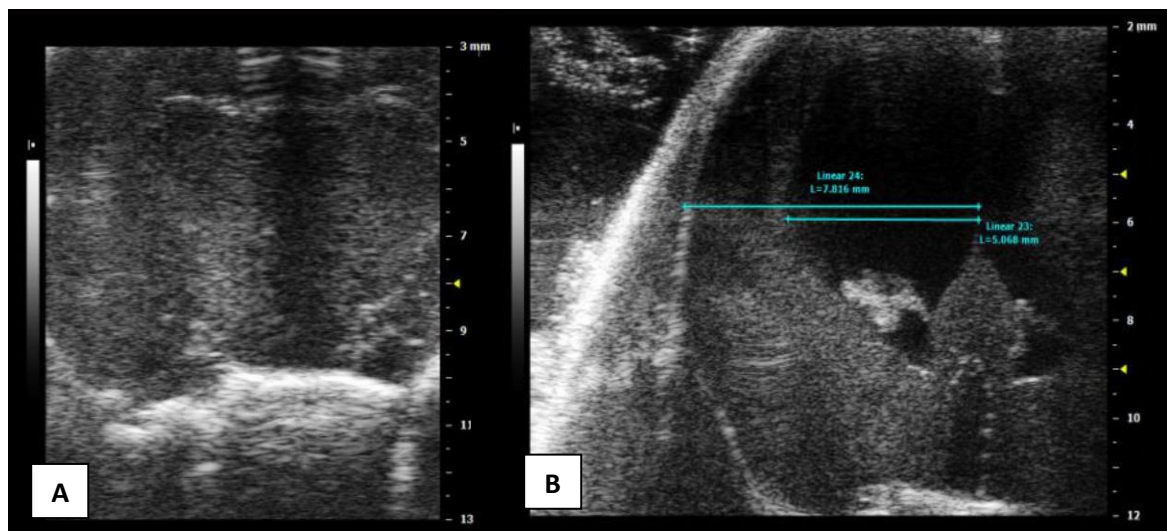


Figura 8: Imagem ultrassonográfica do encéfalo de rato Wistar Hannover sem hidrocefalia (A) e imagem de um rato com hidrocefalia experimental (B), contendo a mensuração da dilatação ventricular. (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

Não foi observada diferença estatística em relação ao peso médio entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (Figura 9). No entanto, foi observada tendência maior no ganho de peso nos grupos tratados com ozonioterapia, especialmente o grupo CO_3 . O peso médio ao final do 21º dia pós-indução (P21) foi de 71,43g no grupo C, 79,62g no grupo CO_3 , 65,25g no grupo HNT e 73,43g no grupo HTO_3 (Figura 10). No quarto dia após a injeção (P4), foi possível observar nos grupos HNT e HTO_3 , uma cabeça em forma de cúpula e/ou fontanela persistente (Figura 11), sendo associada à dilatação ventricular, que se tornou mais evidente no sétimo dia pós-indução (P7). Os ratos hidrocefálicos apresentavam letargia, postura anormal, posição plantígrada dos membros posteriores e alguns casos ataxia e encurvamento das costas. Em dois animais do grupo HNT com hidrocefalia severa, foi possível observar episódios epiléticos.

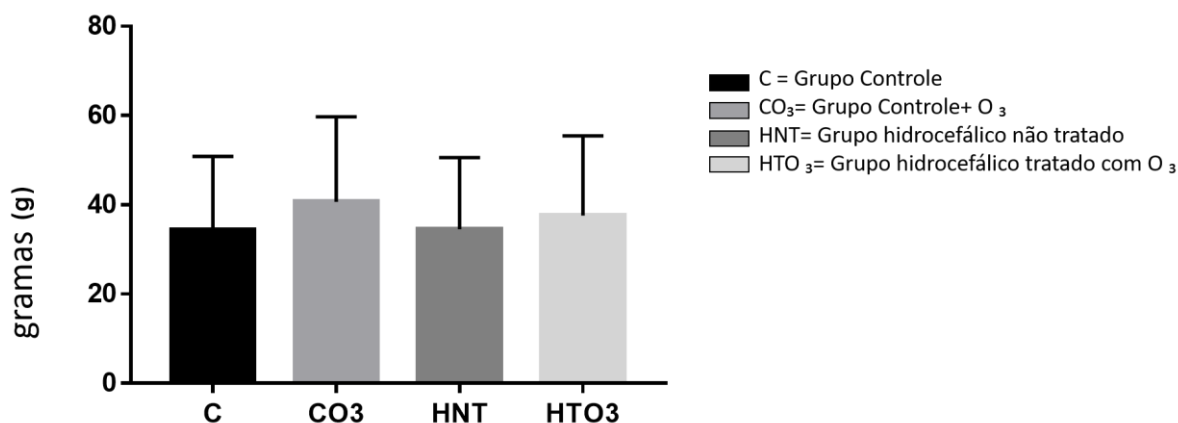


Figura 9: Média do peso dos grupos ao final do 21º dia após-indução (P21). É possível observar que os grupos tratados com ozônio apresentaram maior peso quando comparado aos grupos C e HNT.

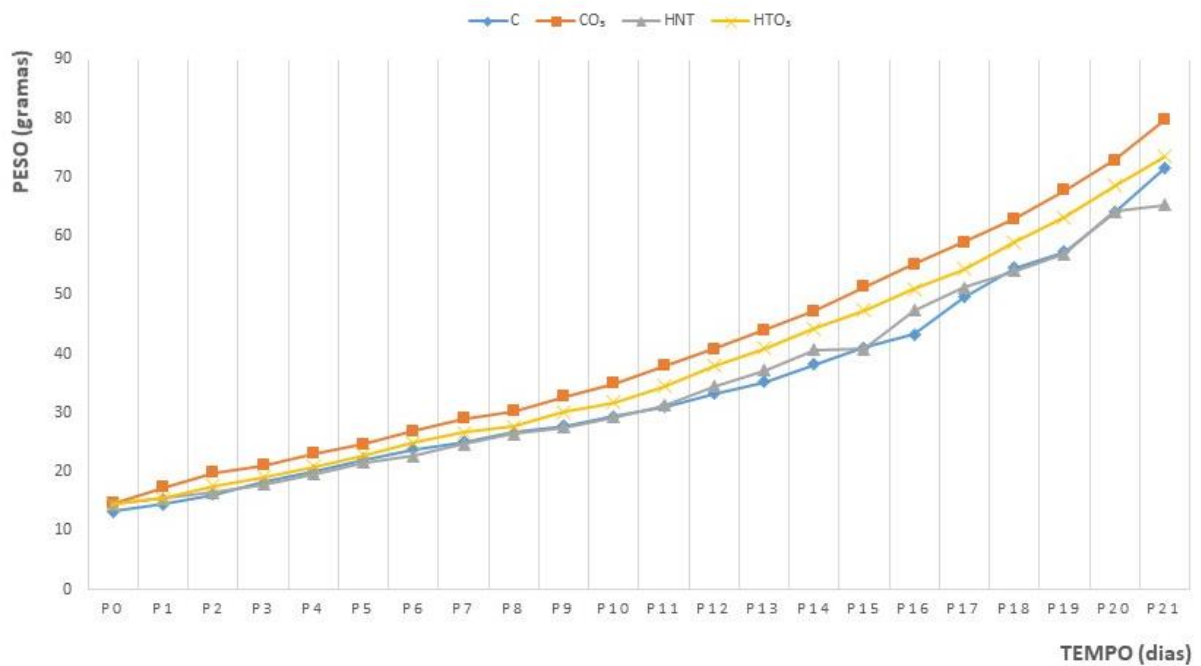


Figura 10: Gráfico evolutivo do peso dos grupos a partir do dia 0 (P0) ao dia 21 (P21) após a indução da hidrocefalia. **C** grupo Controle; **CO₃** grupo Controle com O₃; **HNT** grupo Hidrocefálico não tratado; **HTO₃** grupo Hidrocefálico tratado com O₃. É possível observar que os grupos tratados com ozonioterapia apresentaram maior ganho de peso ao longo do experimento.



Figura 11: Rato Wistar da linhagem Hannover hidrocefálico com crânio em formato de cúpula. (Fonte: Laboratório de Proteção Cerebral na Infância- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

4.3 Tratamento com ozonioterapia

Todos os ratos tratados com ozônio IP foram observados por 15 minutos após a aplicação e não houve nenhuma intercorrência nesta dosimetria (Figura 12).



Figura 12: Rato Wistar macho da linhagem Hannover em contenção durante aplicação de ozonioterapia. Os grupos CO₃ e HTO₃ receberam aplicação de ozônio via IP. (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

4.4 Análise comportamental pelo teste em Campo Aberto (*Open Field*)

Ao avaliar os ratos durante o teste em Campo Aberto, foi possível observar que o escore da marcha foi significativamente reduzido nos animais hidrocefálicos não tratados (HNT) em comparação com os grupos C e CO₃ ($p=0,0202$) (Figura 13). Apesar do grupo HTO₃ não ter demonstrado diferença estatística relevante ao comparar com os demais grupos ($p>0,05$), os animais apresentaram melhor desempenho ambulatorial, maior agilidade, e auto higiene adequada quando comparados ao grupo HNT ao longo do período experimental, como é demonstrado na Figura 13. O desempenho do grupo HTO₃ se aproximou do resultado do grupo C. Ao observar a atividade espontânea dos grupos, pudemos observar que o grupo HNT permaneceu em repouso por mais tempo, demonstrando menor interesse em

explorar a arena e mais lentos. Os ratos hidrocefálicos não tratados apresentaram menor interação social com auto-isolamento, maior descuido com a higiene e sinais de agressividade foram observados em alguns casos. Ao final do período de observação (P16), os ratos do grupo CO₃ apresentaram maior movimentação dentro da arena, maior expressão de comportamento exploratórios e autolimpeza quando comparado ao grupo C e HTO₃ (Figura 14).

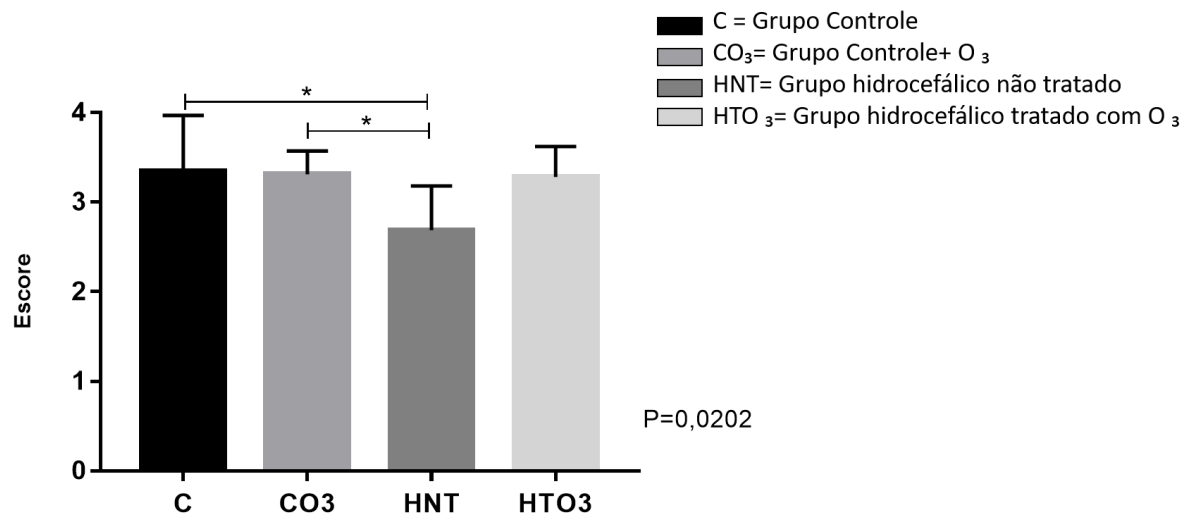


Figura 13: Gráfico representativo do teste de *Open Field* ao final do período de quatro dias de observação. O grupo HNT apresentou escore pior ao comprar com os grupos C e CO₃ *($p < 0,0202$). Apesar de não ter apresentado diferença estatística entre os grupos HTO₃ e HNT, vemos que o grupo HTO₃ obteve melhor desempenho no teste, se aproximando aos resultados dos controles. (Desvio erro padrão: grupo C: 0,221; grupo CO₃: 0,091; grupo HNT: 0,175; grupo HTO₃: 0,119).

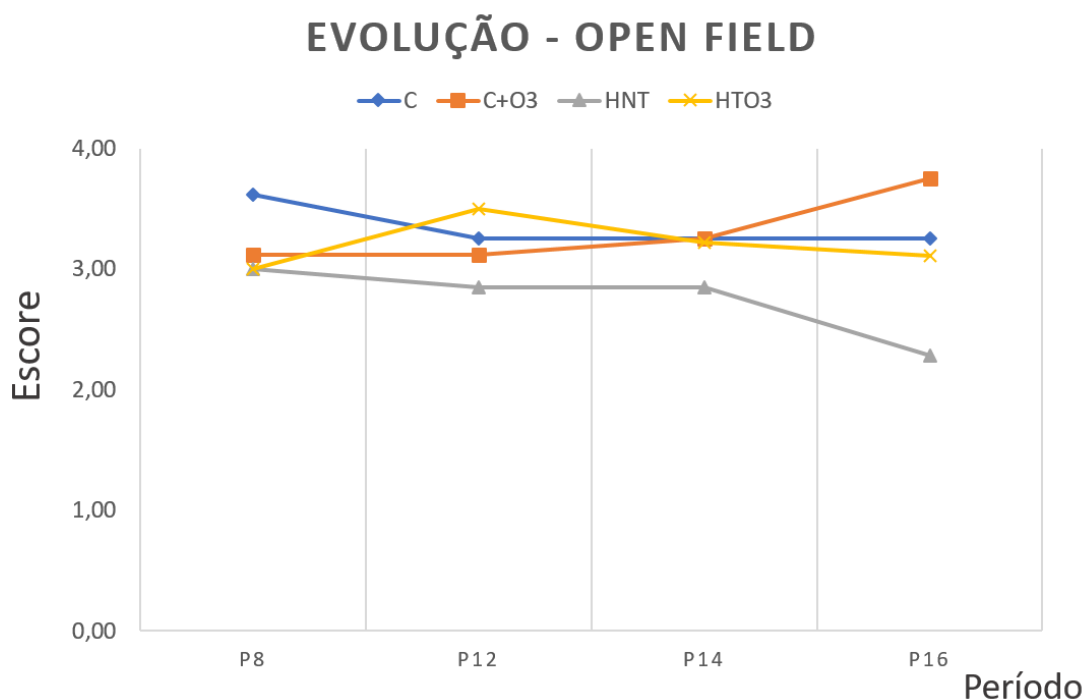


Figura 14: Gráfico evolutivo do teste de *Open Field* dos dias 8 (P8), 12 (P12), 14 (P14) e 16 (P16) após a indução da hidrocefalia. **C** grupo Controle; **CO₃** grupo Controle com O₃; **HNT** grupo Hidrocefálico não tratado; **HTO₃** grupo Hidrocefálico tratado com O₃. É possível observar que o grupo HNT apresentou pior escore ao longo da evolução do teste. Ao final do estudo (P16) o grupo CO₃ apresentou maior atividade comparado ao grupo C. Grupo HTO₃ obteve escore próximos ao grupo C a partir de P12.

4.5 Avaliações histológicas e imunoistoquímicas

Na avaliação histológica em HE dos cérebros dos ratos controle (C) não apresentaram alterações nas regiões avaliadas. Na matriz germinativa, foram encontradas células de núcleo centralizado, com preservação do epêndima e fibras estruturais. No corpo caloso o epêndima apresentou-se conservado, com fibras e núcleo celular preservado (Figura 15). O grupo controle tratado com ozônio (CO₃) apresentou núcleos arredondados no corpo caloso, com preservação das células do epêndima e das fibras estruturais (Figura 16). Na matriz germinativa foram observados núcleos centralizados e em alguns casos núcleos picnóticos, com preservação das fibras estruturais e camada ependimária (Figura 17).

Em ambos os grupos de ratos hidrocefálicos foram observados ventrículos laterais com dilatação moderada à severa e destruição da matriz germinativa na maioria dos animais (Figura 17) ao comparar com o grupo controle. No grupo de ratos hidrocefálicos não tratados (HNT), houve o afilamento significativo do epêndima, com áreas de desnudamento, ruptura e rarefação celular. No corpo caloso, além do adelgaçamento da estrutura, foi possível observar presença de ruptura e edema nas fibras estruturais, rarefação celular, núcleos picnóticos e/ou com formatos irregulares, além de células em apoptose presentes ao longo de toda região em todas as amostras (Figura 16). Na matriz germinativa foi observada áreas com ruptura, desnudamento e células em apoptose no epêndima, rarefação celular e vacuolização (edema) com ruptura das fibras estruturais. Células com núcleos picnóticos e em apoptose foram observados na matriz germinativa em grande quantidade (Figura 17). Ao avaliar o corpo caloso dos animais do grupo hidrocefálico tratado com ozônio (HTO₃), pode ser observado na maioria das amostras células de núcleos arredondados e centralizados, com presença de núcleos picnóticos e nos animais com hidrocefalia mais grave, células em apoptose e degeneração axonal, porém em menor número ao comparar com o grupo HNT. Apesar das alterações presentes, pode ser observado que o grupo HTO₃ apresentou maior número de células no corpo caloso e epêndima quando comparado ao grupo HNT. As fibras estruturais apresentaram edema em menor grau e com melhor integridade ao comparar com o grupo HNT. A camada ependimária na maioria dos animais permaneceu intacta, com preservação celular, apesar de seu adelgaçamento (Figura 16). Na matriz germinativa foram observadas células com núcleo picnótico, vacuolização entre as fibras estruturais e células em apoptose em menor quantidade em relação ao grupo HNT. No epêndima, foram evidenciadas áreas com desnudamento. No entanto, o número de células ependimárias foi maior quando comparado ao grupo de ratos hidrocefálicos não tratados.

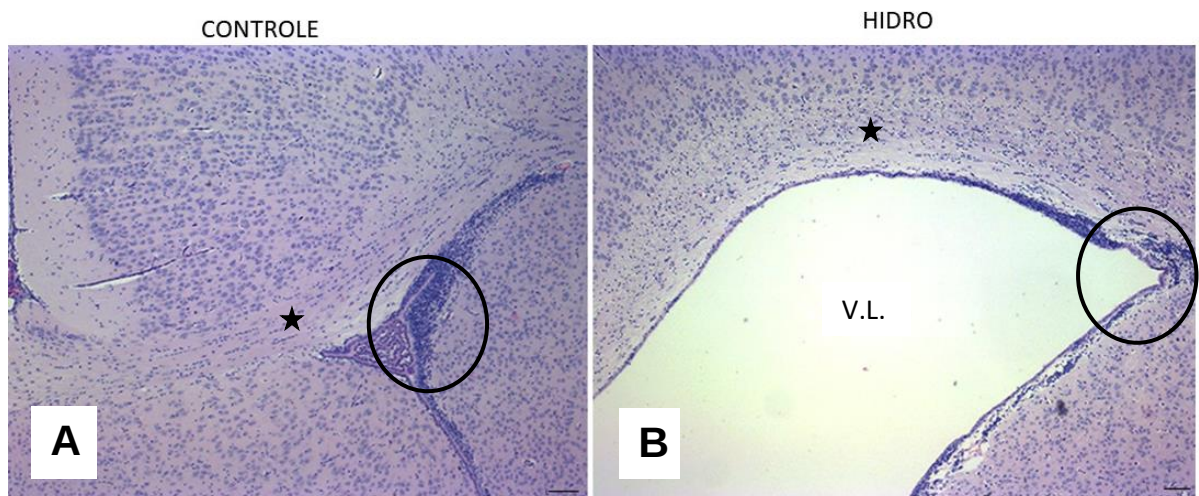


Figura 15: Fotomicrografias de lâminas histológicas do cérebro de ratos Wistar da linhagem Hannover. A= rato controle (**C**); B= rato hidrocefálico não tratado (**HNT**). Na figura A nota-se o corpo caloso (estrela) e matriz germinativa (círculo) preservado. Na imagem B é visibilizada área com corpo caloso com alongamento e afinamento das fibras estruturais do corpo caloso (estrela em imagem B), área de dilatação do ventrículo lateral (VL), com diminuição celular da matriz germinativa (círculo em imagem B). Hematoxilina e eosina. Ampliação objetiva 10X. Barra de escala = 200 μ m (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

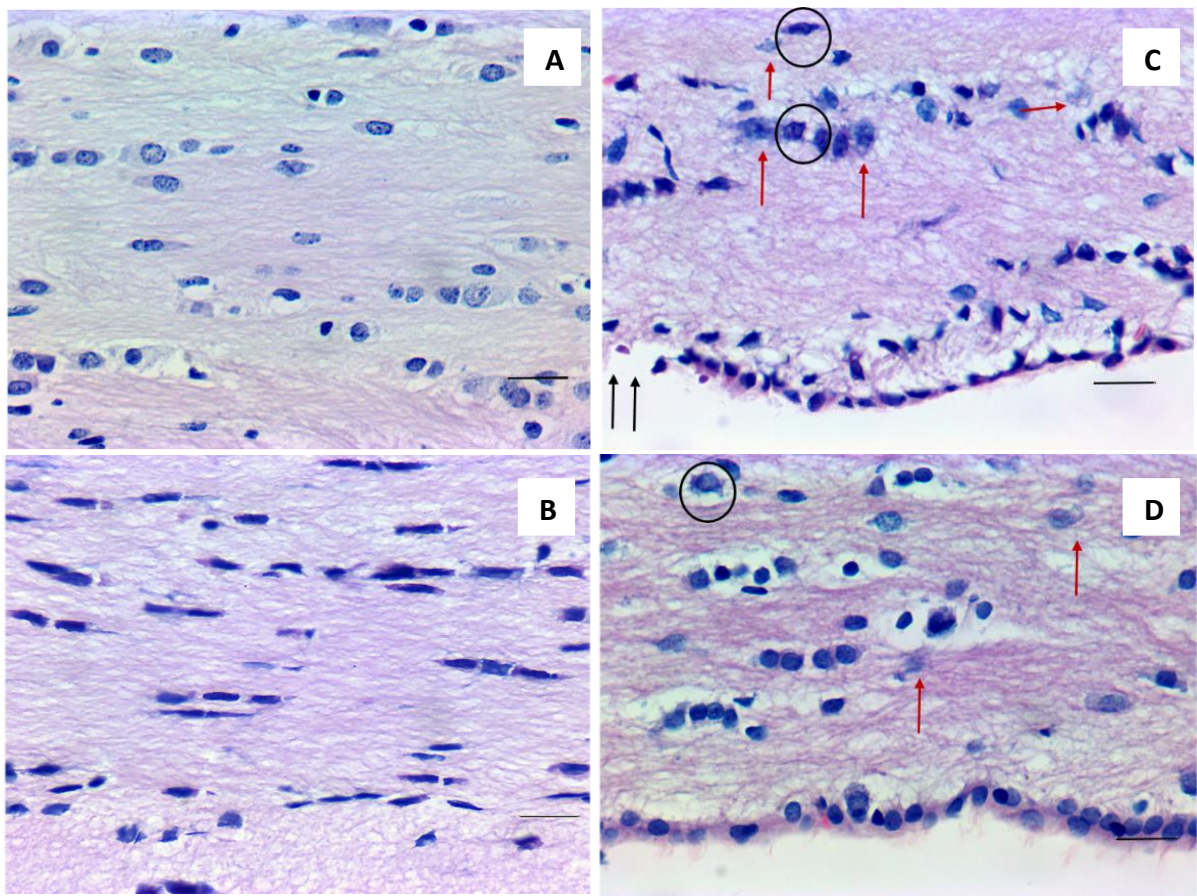


Figura 16: Fotomicrografias de lâminas histológicas do cérebro de ratos Wistar da linhagem Hannover da região do corpo caloso. **A=** Grupo controle (C); **B=** Grupo controle tratado com ozônio (CO_3); **C=** Grupo hidrocefalia não tratado (HNT); **D=** Grupo hidrocefálico tratado com ozônio (HTO_3). Os animais do grupo C e CO_3 apresentam células com núcleos centralizados, com preservação do epêndima e corpo caloso. Presença de células com núcleo picnótico (circulo) e apoptose em diferentes fases (seta vermelha) no corpo caloso do grupo HNT e em menor quantidade no grupo HTO_3 . Ainda é possível observar ruptura do epêndima (seta preto) no grupo HNT. Observou-se menor quantidade de células de núcleo picnótico e em apoptose no grupo HTO_3 quando comparado ao grupo HTN. Hematoxilina e eosina. Ampliação objetiva 40X. Barra de escala = 20 μm (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

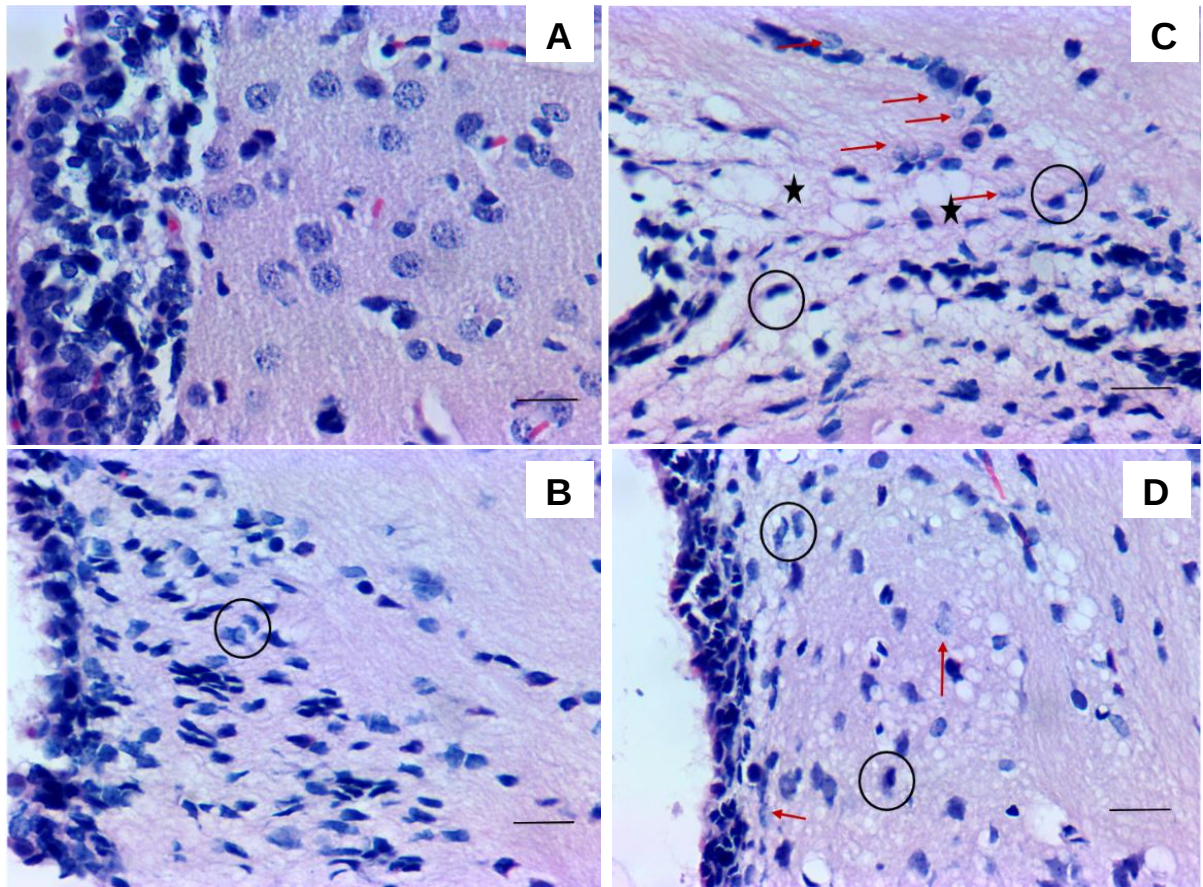


Figura 17: Fotomicrografias de lâminas histológicas do cérebro de ratos Wistar da linhagem Hannover da região da matriz germinativa. **A=** Grupo controle; **B=** Grupo controle tratado com ozônio; **C=** Grupo hidrocefalia não tratado; **D=** Grupo hidrocefálico tratado com ozônio. Os animais do grupo C e CO_3 apresentam células com núcleos centralizados, com preservação do epêndima e matriz germinativa. Presença de células com núcleo picnótico (circulo), apoptose em diferentes fases (seta vermelha) e vacuolização (edema) das fibras estruturais (estrela) na matriz germinativa no grupo HNT e em menor quantidade no grupo HTO_3 . Hematoxilina e eosina. Ampliação objetiva 40X. Barra de escala = 20 μm (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

Na análise imunoistoquímica, averiguaram-se astrócitos reativos marcados com anticorpo anti-GFAP e a densidade celular por área foi calculada. Para o cálculo da densidade celular, foi considerada na amostragem apenas a contagem de astrócitos reativos com escore 2. No corpo caloso, a área média calculada foi de 294 mm² e a contagem média de astrócitos reativos nos animais controles foi de 5,00 astrócitos /mm², no grupo CO₃ média de 5,08 astrócitos/mm², 13,44 astrócitos/ mm² no grupo HNT e 7,08 astrócitos/ mm² no grupo HTO₃. A imunocoloração do GFAP revelou no grupo HNT astrócitos intensamente corados com processos hipertróficos e um número pronunciado de astrócitos reativos no corpo caloso ($p < 0,02$) quando comparado ao grupo CO₃ e controle (Figura 18). A marcação astrocitária recebeu o escore de 2. Entretanto, o grupo HTO₃ apresentou imunocoloração discreta com prolongamentos astrocitários mais delicados no corpo caloso e com menor densidade celular quando comparado ao grupo HNT, recebendo escore 1. Não foi observada diferença estatística entre o grupo HNT e HTO₃. Contudo, é visível a redução do número de astrócitos reativos no grupo hidrocefálico tratado quando comparado ao grupo hidrocefálico não tratado (Figura 19). Os grupos controle e CO₃ receberam escore 0 por não apresentarem marcação GFAP.

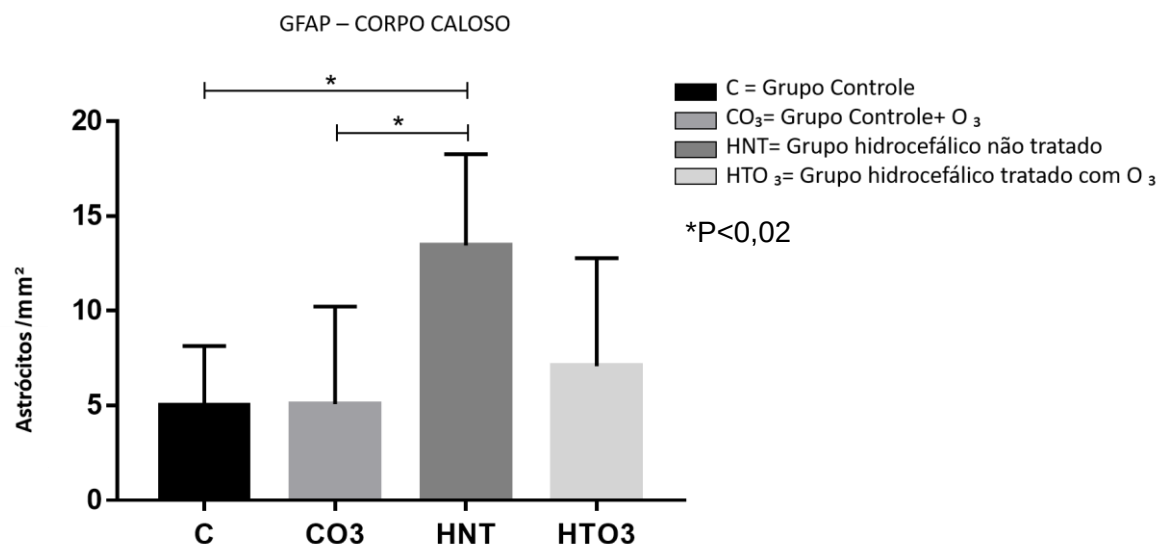


Figura 18: Gráfico representativo da atividade astrocitária revelados pela imunocoloração GFAP na região do corpo caloso. O grupo HNT exibiu maior atividade astrocitária quando comparado aos grupos C e CO₃. * $p < 0,02$. (Desvio erro padrão: grupo C: 1,403; grupo CO₃: 1,820; grupo HNT: 1,965; grupo HTO₃: 2,153).

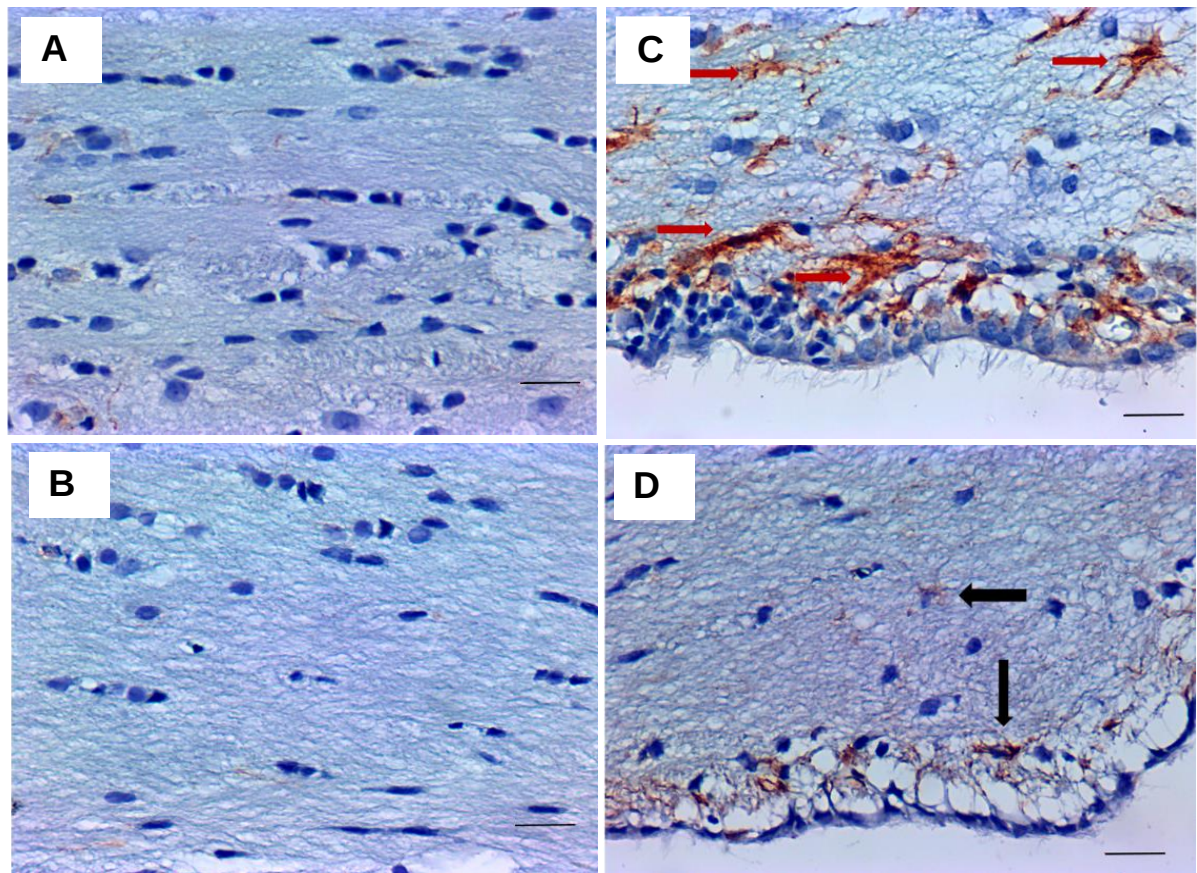


Figura 19: Fotomicrografias de lâminas imunocorada com GFAP do cérebro de ratos Wistar da linhagem Hannover da região do corpo caloso. **A=** Grupo controle (C); **B=** Grupo controle tratado com ozônio (CO_3); **C=** Grupo hidrocefalia não tratado (HNT); **D=** Grupo hidrocefálico tratado com ozônio (HTO_3). É possível evidenciar na periferia da lesão, a marcação intensa dos astrócitos com processos hipertróficos no corpo caloso no grupo HNT (seta vermelha). A marcação discreta dos astrócitos com prolongamentos finos é visível no corpo caloso do grupo HTO_3 (seta preta). Ampliação objetiva 40X. Barra de escala = 20 μm (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

Não houve diferença estatística entre os grupos na análise de imunocoloração de GFAP na matriz germinativa. A área média calculada foi de 292 mm² e a contagem média de astrócitos reativos nos animais controles foram de 9,00 astrócitos /mm², no grupo CO₃ média de 17,67 astrócitos/mm², 13,33 astrócitos/ mm² no grupo HNT e 19 astrócitos/ mm² no grupo HTO₃. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, observou-se tendência de maior concentração de astrócitos reativos nos animais hidrocefálicos tratados com ozonioterapia (HTO₃) quando comparado o grupo controle (Figura 20). A coloração imunoistoquímica do GFAP revelou no grupo HNT e HTO₃ astrócitos intensamente corados com processos hipertróficos e um número pronunciado de astrócitos reativos na matriz germinativa quando comparado ao grupo controle, recebendo escore 2. Enquanto que no grupo CO₃ foram observados astrócitos de prolongamentos finos e mais delicados, indicando escore 1. O grupo controle recebeu escore 0 uma vez que a imunocoloração do GFAP foi negativa para esse grupo (Figura 21).

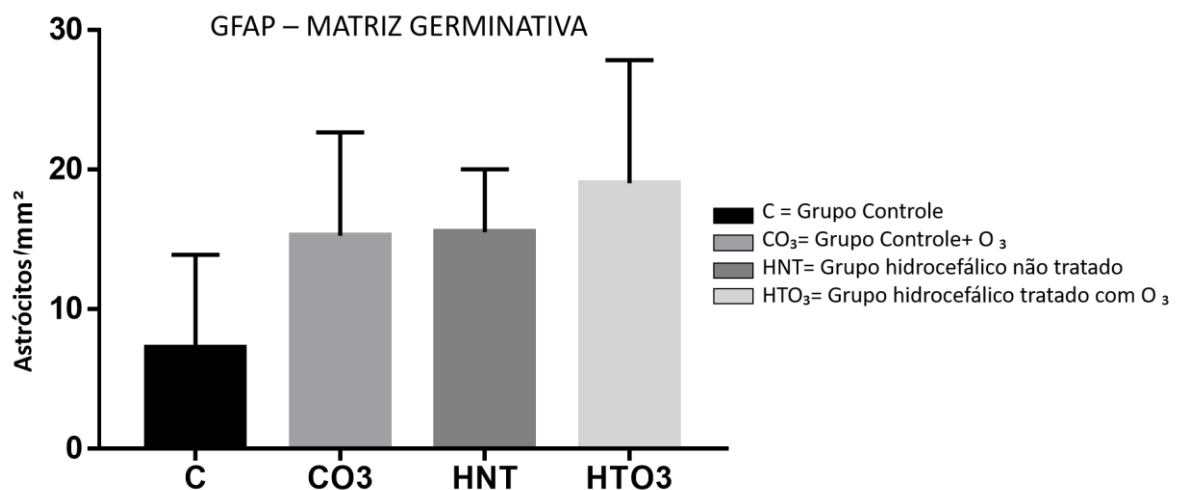


Figura 20: Gráfico representativo da atividade astrocitária revelados pela imunocoloração GFAP na região de matriz germinativa. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados. Foi observado uma tendência de maior expressão de imunocoloração GFAP no grupo HTO₃.

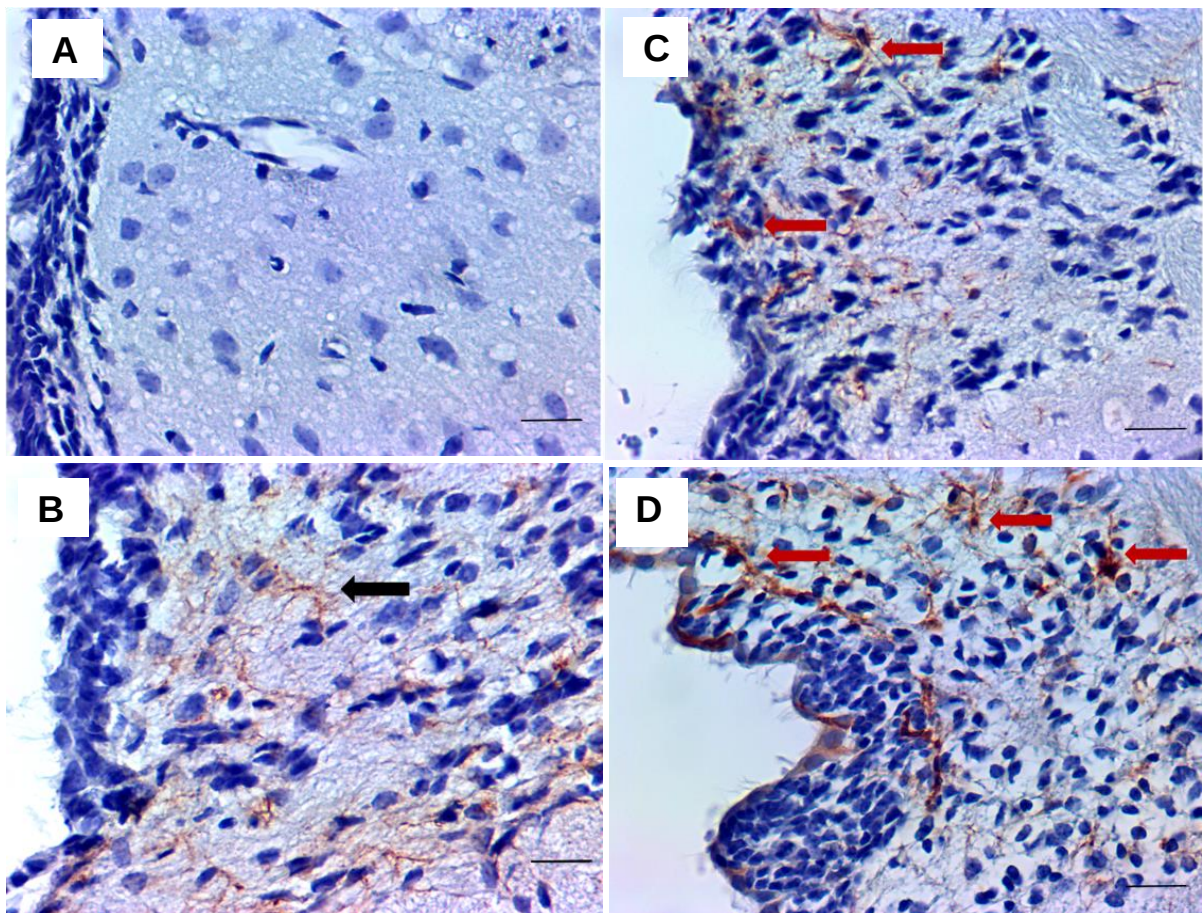


Figura 21: Fotomicrografias de lâminas imunocorada com GFAP do cérebro de ratos Wistar da linhagem Hannover da região da matriz germinativa. **A**= Grupo controle (C); **B**= Grupo controle tratado com ozônio (CO_3); **C**= Grupo hidrocefalia não tratado (HNT); **D**= Grupo hidrocefálico tratado com ozônio (HTO_3). É possível evidenciar a marcação intensa dos astrócitos com processos hipertróficos na matriz germinativa dos grupos HNT e HTO_3 (seta vermelha). A marcação discreta dos astrócitos com prolongamentos finos é visível no grupo CO_3 (seta preta). Ampliação objetiva 40X. Barra de escala = 20 μm (Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP).

5- DISCUSSÃO

A hidrocefalia está relacionada a vários danos encefálicos, em especial das estruturas periventriculares. O estiramento e a compressão do tecido nervoso acarretam redução do fluxo sanguíneo local, gerando edema, estase, processos isquêmicos e hipóxia dos tecidos encefálico. O suprimento reduzido de oxigênio, ATP e o acúmulo de glutamato no cérebro estão diretamente relacionados aos processos inflamatórios, degenerativos e oxidativos em pacientes com hidrocefalia (Socci et al., 1999; Di Curzio et al., 2014; Toklu et al., 2017). Para melhor compreensão dos processos fisiopatológicos e terapêuticos da hidrocefalia, um modelo experimental pode ser produzido utilizando injeções intracisternal de caulim. Tal procedimento simples, confiável e barato permite o estudo dos efeitos da lesão sobre o comportamento e evolução clínica em ratos (Lopes et al., 2009; Di Curzio et al., 2013).

De forma semelhante a este estudo, trabalhos anteriores usando o mesmo modelo de indução com caulim demonstraram que ratos hidrocefálicos obtiveram ganho de peso tardio em relação aos animais controles (Catalão et al., 2017; Tida et al., 2018). Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, é possível observar tendência de ganho de peso nos grupos de animais tratados com ozônio. O grupo HTO₃ demonstrou ganho de peso próximo ao controle, enquanto o grupo CO₃ apresentou maior ganho. Isso pode representar melhor adaptação dos animais tratados com ozônio, permitindo retornar à alimentação normal. Entende-se que a ozonioterapia tenha sido capaz de proporcionar maior oxigenação e controle inflamatório central nos ratos, desencadeando uma otimização da atividade cognitiva e física nos animais dos grupos HTO₃ e CO₃.

É de amplo conhecimento que o comprometimento do fluxo sanguíneo faz parte da neuropatologia da hidrocefalia causando danos variados à substância branca periventricular (Deren et al., 2010; Del Bigio et al., 2016). A oxigenação reduzida no cérebro pode estar relacionada aos déficits cognitivos observados em pacientes hidrocefálicos (Catalão et al., 2017), enquanto a ozonioterapia tem sido associada a efeitos benéficos na isquemia e acidente vascular cerebral (Frosini et

al., 2012; Bahar et al., 2017; Resitoglu et al., 2018). Portanto, previa-se que a aplicação de ozônio via intraperitoneal pudesse desencadear influência positiva na hidrocefalia. Para avaliação comportamental optou-se pelo teste de campo aberto modificado (*Open Field*) para analisar o desenvolvimento motor precoce, comportamento ambulatorial de autolimpeza, exploração ambiental e avaliação postural. O teste é usado rotineiramente com sucesso para avaliar a evolução da hidrocefalia induzida (Catalão et al., 2017; Da Silva et al., 2018; Tida et al., 2018).

No presente estudo, foi possível observar que apesar de não demonstrar diferença estatística entre os grupos, evidenciou-se que os ratos dos grupos HTO₃ apresentou resultado próximo ao grupo controle durante atividade de teste comportamental. Em comparação, o grupo HNT demonstrou menor interação com o ambiente durante o teste. Os déficits cognitivos e motores são decorrentes de prejuízos na proliferação celular durante o desenvolvimento do cérebro (Olopade et al., 2012), enquanto a melhora cognitiva poderia estar associada à ação neuroprotetora das enzimas antioxidantes produzidas pelo tratamento com ozônio. Assim como os antioxidantes livres, os antioxidantes endógenos são capazes de reverter processos oxidativos crônicos e preservar as células da oxidação e inflamação (Sagai e Bocci, 2011). De maneira semelhante, Resitoglu et al. (2018) avaliaram os efeitos neuroprotetores do ozônio em ratos neonatos com lesão cerebral isquêmica. Os animais tratados exibiram melhora da função cognitiva e ação anti-apoptose em comparação ao grupo não tratado. É possível que a ozonioterapia seja capaz de estimular o sistema neuroendócrino nos animais, justificando o comportamento exploratório aumentado dos animais do grupo CO₃. Na maioria dos pacientes humanos, é relatada sensação de bem-estar após terapia com ozônio. É possível que exista a produção aumentada de endorfina e serotonina, elucidando a sensação de euforia e bem-estar após a terapia com ozônio (Sagai e Bocci, 2011).

Muito embora diferentes trabalhos utilizem ressonância magnética para mensurar a ventriculomegalia e confirmar a presença da hidrocefalia (Deren et al., 2010; Di Curzio et al., 2014), a ultrassonografia de crânio mostrou ser eficaz na confirmação da hidrocefalia nos animais induzidos. Ainda que apresente menor

precisão ao mensurar os ventrículos laterais, a ultrassonografia de crânio possui a vantagem de ser de baixo custo e rápida aplicação (Brown et al., 1984).

Embora ambos os grupos hidrocefálicos apresentaram expansão ventricular, uma vez que a ozonioterapia não interfere na progressão da ventriculomegalia, na análise morfológica qualitativa dos cortes em coloração HE, observou-se que os ratos do grupo HTO₃ apresentaram menor número de células em processo degenerativo e morte celular em relação ao grupo HNT. Os mecanismos de dano celular podem ser desencadeados pela deficiência de oxigênio e energia, aumento excessivo de neurotransmissores excitatórios e radicais livres, gerando uma cascata de eventos neurodegenerativos (Morgan et al., 2005; Deren et al., 2010). Espécies reativas de oxigênio (ROS) e a peroxidação lipídica (LOPs) são ameaças reais aos ácidos nucleicos e ácidos graxos poliinsaturados nas paredes celulares (Del Bigio e Di Curzio, 2016). Antioxidantes endógenos como glutathione peroxidase (GSH-px), CAT e SOD são enzimas produzidas importantes para proteção oxidativa das estruturas biológicas.

A aplicação de ozônio permite aumentar a disposição de oxigênio no plasma e hemoglobinas e ao mesmo tempo que promove a produção de fatores de transcrição genética como Nrf-2, que estimula o núcleo celular a produzir enzimas antioxidantes e enzimas de desintoxicação de fase II (Delgado- Roche et al., 2017). As mesmas alterações foram observadas por Bahar et al. (2017), ao compararem os efeitos neuroprotetores do ozônio em cérebros isquêmicos de ratos neonatos. Ao avaliarem o córtex cerebral, foi constatado que houve redução significativa de células inflamatórias, necróticas ou com núcleo eosinofílico nos animais tratados com ozonioterapia via IP (Bahar et al., 2017). Além disso, o ozônio mostrou ser eficaz preservando as células de Purkinje dos processos degenerativos relacionadas à idade. Áreas cerebelares de ratos tratados com ozônio obtiveram menor expressão dos marcadores de apoptose (Caspase-3), de estresse oxidativo (iNos) e astrogliose (GFAP). Ademais, notou-se aumento relevante na expressão de Mab2, importante marcador de neurogênese (Elkholy e Al-Gholam, 2018). Outro fator relevante observado neste estudo foi a redução de edema entre as fibras estruturais no grupo HTO₃. Os achados corroboram Frosini et al. (2012) que evidenciaram

redução do edema tecidual em amostras de hipocampo de ratos após indução isquêmica experimental.

Na análise imunoistoquímica do corpo caloso, os animais HNT apresentaram reação astrocitária elevada comparada aos animais do grupo controle. A astrogliose reativa é caracterizada pela alta proliferação astrocítica e ampla hipertrofia e/ou hiperplasia do corpo celular e processos citoplasmáticos que ocorrem em resposta a todo tipo de insulto ao SNC, incluindo hidrocefalia. Nas lesões hidrocefálicas, a ativação astrocitária é um fenômeno comum (Deren et al., 2010; Santos et al., 2019). Durante a lesão do SNC, os astrócitos se tornam reativos, migram para o local lesionado formando extensa rede fibrilar que pode interferir negativamente na regeneração axonal, na plasticidade sináptica e na recuperação funcional do SNC. Quanto maior a gravidade da lesão, mais intensa será a reação astrocitária local (Hamby e Sofroniew, 2010; Da Silva et al., 2018).

No presente estudo foi possível observar redução na expressão da proteína do ácido fibrilar glial nos ratos HTO₃ quando comparados ao grupo hidrocefálico não tratado, apesar de não revelar diferença estatística entre os grupos, o que poderia ter acontecido devido ao número de amostras. Esse resultado demonstra que a terapia com ozônio atenuou o conteúdo astrogliar reativo, auxiliando na recuperação morfológica e funcional do SNC. A ozonioterapia demonstrou resultado semelhante em cérebros de ratos em processo neurodegenerativo relacionado à idade. Ao avaliar regiões de cerebelo e córtex frontal, os animais idosos tratados obtiveram menor expressão GFAP, caspase-3 e MDA além de aumentarem significativamente a expressão de enzimas antioxidantes como SOD, GSH e CAT (Elkholy e Al-Gholam, 2018; El-Mehi e Faried, 2019).

Os astrócitos são frequentemente usados nas pesquisas como principal marcador de neuropatias no cérebro. No entanto, estas células são elemento chave para orquestração de um ambiente dinâmico, atuando na regulação da inflamação, na redução de neurotransmissores excitotóxicos como glutamato, edemas vasogênicos e controle do estresse oxidativo (Zhou et al., 2008; Hamby e Sofroniew, 2010). Moléculas de ROS como H₂O₂ e glutamato atuam como chaves sinalizadoras do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), promovendo a síntese de elementos de resposta

antioxidante (ARE). Astrócitos reativos que expressam Nrf2 permitem que os astrócitos sintetizem sua própria SOD e glutathione reduzida (GSH) (Zhou et al., 2008; Hamby e Sofroniew, 2010; Sagai e Bocci, 2011; Bolaños, 2016). Isso proporciona alta tolerância dos astrócitos ao estresse oxidativo, possibilitando uma defesa antioxidante aos neurônios próximos (Bolaños, 2016). Em estudo com culturas de células astrogliais, foi demonstrado que concentrações de ozônio de 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de aumentar a concentração da enzima antioxidante SOD e de reduzir a concentração de malondialdeído (MDA), um importante indicador de peroxidação lipídica. A aplicação de ozônio em baixa concentração exibiu atividade neuroprotetora, reduzindo o número de células mortas no meio de cultura (Zhou et al., 2008).

Outros estudos demonstraram que alterações sutis na atividade astrocitária pode trazer benefícios ou prejuízos ao tecido lesionado (Hamby e Sofroniew, 2010). Do mesmo modo, a linha entre a efetividade e toxicidade do ozônio dependerá da força do estresse oxidativo. A geração de estresse oxidativo alto sobre o astrócitos resulta em uma resposta inflamatória através da ativação do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), estimulando a produção de COX-2, NOS-2 dentre outras citocinas (Zhou et al., 2008; Hamby e Sofroniew, 2010; Sacai e Bocci, 2011). Entretanto, o estresse oxidativo controlado ativa a expressão Nrf2, induzindo a produção de inúmeras enzimas antioxidantes, como SOD, GSH e CAT (Zhou et al., 2008; Hamby e Sofroniew, 2010).

Partindo desse princípio, ao avaliar a matriz germinativa, podemos observar comportamentos distintos dos astrócitos nos grupos experimentais. Apesar de não ser observada diferença estatística entre os grupos, a expressão do GFAP grupo CO₃, HNT e HTO₃ a reação astrocitária revelou-se de forma massiva ou intensa. Pressupõe-se que as células presentes na matriz germinativa sejam mais susceptíveis ao estresse oxidativo que as células do corpo caloso. A matriz germinativa é caracterizada pela alta vascularização e concentração de células imaturas, formando uma estrutura frágil e complexa (Luo et al., 2018). Além da elevada compleição de fosfolípidios insaturados no tecido, a imaturidade celular admite que os níveis de enzimas antioxidantes sejam insuficientes, tornando o

cérebro do rato neonato extremamente susceptível ao estresse oxidativo, demandando exclusivamente da proteção antioxidante fornecida pelos astrócitos locais (Lekic et al., 2015; Nuñez et al. 2018). Todavia, apesar da presença exuberante de astrócitos reativos na matriz germinativa do grupo HTO₃, postula-se a hipótese de um possível efeito neuroprotetor ao considerarmos as alterações identificadas na coloração HE quando comparado ao grupo HNT. Vale ressaltar que foi evidenciada redução de vacúolos, menor número de células em apoptose, com preservação do epêndima e formato celular. Além disso, os animais hidrocefálicos tratados apresentaram melhor desempenho no teste comportamental e maior ganho de peso quando comparado ao grupo hidrocefálico não tratado. Contudo tais evidências seriam melhor presumidas por meio de análises bioquímicas e imunoistoquímicas específicas.

6- CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que ratos neonatos tratados com ozônio apresentam melhor desenvolvimento sensório-motor e deambulatório durante teste comportamental, além de obterem melhor desenvolvimento físico comparado ao grupo de ratos hidrocefálicos não tratado. Os achados de estudo sugerem que a terapia com O₃ possui potencial efeito neuroprotetor ao controlar processos degenerativos celulares inibindo a astrogliose excessiva no corpo caloso, oferecendo benefícios às estruturas afetadas pela dilatação ventricular.

7- REFERÊNCIAS

Albuquerque DF, Cortez AA, Matos AVS (2018) Hidrocefalia em cão: relato de caso clínico [Internet]. In: **Anais do 35o Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**; 2008; Gramado. Gramado: CONBRAVET; 2008 [cited 2014 Jul 2]. Disponível em: <www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/549.pdf 2>. Acesso em 20 out. 2018.

Azuma K, Mori T, Kawamoto K, Kuroda K, Tsuka T, Imagawa T, Osaki T, Itoh F, Okamoto SMY (2014) Anti-inflammatory effects of ozonized water in an experimental mouse model. **Biomedical reports** 2:671-674. Disponível em: <DOI: 10.3892/br.2014.290>. Acesso em: 10 jan. 2019.

Bahar L, Gul L, Yildiz F, Resitoglu B, Erturk Se, Celik Y (2017) The Effects of FGF2 and Ozone Applications to Experimental Hypoxic Ischemic Rat Cerebrum. **Kasmera** 45:1-21.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview structure, regulation, and clinical implication. **Neurobiology of Disease** 16:1-13. Disponível em: < doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016>. Acesso em 15 fev. 2020.

Bocci V, Zanardi I, Travagli V (2011) Ozone: A New Therapeutic Agent in Vascular Diseases. **American Journal of Cardiovascular Drugs** 11:73-82.

Bocci V, Zanardia I, Valacchib G, Borrellic E, Travagli V (2015) Validity of Oxygen-Ozone Therapy as Integrated Medication Form in Chronic Inflammatory Diseases. **Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets**.15:127-138.

Bolaños JP (2016) Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neural activity. **Journal of neurochemistry** 139:115–125.

Braidly N, Izadi M, Sureda A, Jonaidi-Jafari N, Banki A, Nabavi SF, Nabavi SM (2018) Therapeutic Relevance of Ozone Therapy in degenerative diseases: Focus on Diabetes and Spinal Pain. **Journal of Cellular Physiology** 233:2705-2714. Disponível em: <DOI 10.1002/jcp.26044>. Acesso em: 10 jan. 2019.

Brown JA, Rachlin J, Rubin, JM, Wollmann RL (1984) Ultrasound Evaluation of Experimental Hydrocephalus in Dogs. **Surgical Neurology International** 22:273-6.

Catalão CHR, Shimizu GY, Tida JA, Garcia CAB, Dos Santos AC, Salmon CEG, Rocha MJA, Lopes LS (2017) Environmental enrichment reduces brain damage in hydrocephalic immature rats. **Child's Nervous System** 33: 921-931. Disponível em: < DOI 10.1007/s00381-017-3403-4>. Acesso em: 10 jan. 2019.

Clavoa B, Suarez G, Aguilar Y, Gutierrez D, Ponce P, Cuberod A, Robaina F, Carreras JL (2011) Brain Ischemia and Hypometabolism Treated by Ozone Therapy. **Forsch Komplementmed** 18:283–287.

Cuadrado A (2016) NRF2 in neurodegenerative diseases. **Current Opinion in Toxicology** 1 46-53. Disponível em:<DOI: 10.1016/j.cotox.2016.09.004>. Acesso em: 02 dez. 2018.

Da Silva SC, Feres O, Beggiora PS, Machado HR, Menezes-Reis R, Araújo JE, Brandão RA, Lopes LS (2018) Hyperbaric oxygen therapy reduces astrogliosis and helps to recovery brain damage in hydrocephalic young rats. **Child's Nervous System** 34:1125-1134. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00381-018-3803-0>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

Davis GH. Fetal Hydrocephalus (2003) **Clinics in Perinatology** 30:531-539.

Defeo DR, Myers P, Folts EL, Everett B, Ramshaw B. (1979) Histological examination of kaolin-induced hydrocephalus. **Journal of Neurosurgery** 50:70–74.

Delgado-Rochea L, Riera-Romoa M, Mestab F, Hernández-Matosc Y, Barriosd JM, Martínez-Sánchez G, Al-Dalaien SM (2017) Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. **European Journal of Pharmacology** 811:148-154. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.017>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

Del Bigio MRD, Di Curzio DL (2016) Nonsurgical therapy for hydrocephalus: a comprehensive and critical review. **Fluids and Barriers of the CNS** 13: 1-20.

Deren KE, Packer M, Forsyth J, Milash B, Abdullah OM, Hsu EW, McAllister JP (2010) Reactive astrogliosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. **Experimental Neurology** 226:110-119.

Di Curzio DL, Buist RJ, Del Bigio MR (2013) Reduced subventricular zone proliferation and white matter damage in juvenile ferrets with kaolin-induced hydrocephalus. **Experimental Neurology** 248:112-128. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.06.004>>. Acesso em: 03 fev. 2020.

Di Curzio D, Turner-Brannen E, Del Bigio MR (2014) Oral antioxidant therapy for juvenile rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Fluids and Barriers of the CNS** 11:1-10.

Dixon WE, Heller H (1932) Experimentelle Hypertonie durch Erhöhung des intrakraniellen Druckes. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie** 166: 265-275.

Donnelly J, Czosnyka M, Harland S, Varsos GV, Cardim D, Robba C, Liu X, Ainslie P. N, Smielewski P (2018) Increased ICP and Its Cerebral Haemodynamic Sequelae. **Intracranial Pressure & Neuromonitoring XVI** - Acta Neurochirurgica Supplement. 126: 47-50. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-65798-1_10>. Acesso em: 02 dez. 2018.

Elkholy WB, Al-Gholam MA (2018) Role of medical ozone in attenuating age-related changes in the rat cerebellum. **Microscopy** 67:214–221. Disponível em: <[doi:10.1093/jmicro/dfy017](https://doi.org/10.1093/jmicro/dfy017)>. Acesso em: 15 jan. 2019.

El-Mehi AE, Faried MA (2019) Controlled ozone therapy modulates the neurodegenerative changes in the frontal cortex of the aged albino rat. **Annals of Anatomy** 227:1-32.

Frosini M, Contartese A, Zanardi I, Travagli V, Bocci V (2012) Selective ozone concentrations may reduce the ischemic damage after a stroke. **Free Radical Research** 46:612–618.

Gage GJ, Kipke DR, Shain W (2012) Whole animal perfusion fixation for rodents. **Journal of Visualized Experiments** 65:1-9. Disponível em: <[doi:10.3791/3564](https://doi.org/10.3791/3564)>. Acesso em: 21 jan. 2020.

Glezer I, Marcourakisa T, Avellar MCW, Gorensteina C, Scavone C (2000) The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Revista Brasileira de Psiquiatria** 22:26-30.

Hamby ME, Sofroniew MV (2010) Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics** 7: 494–506.

Inder TE, Darras BT, Vries LS, Plessis A, Neil J, Perlman J M, Volpe J (2017) **Volpe's Neurology of the Newborn**. 6a ed: Elsevier.

ISCO3 (2020) Madrid Declaration on Ozone Therapy, 3 a ed. Madrid. International Scientific Committee of Ozone Therapy. www.isco3.org.

Lekic T, Klebe D, Poblete R, Krafft PR, Rolland WB, Tang J, Zhang JH (2015) Neonatal Brain Hemorrhage (NBH) of Prematurity: Translational Mechanisms of the Vascular-Neural Network. **Current Medicinal Chemistry** 22:1214–1238.

Lopes LS, Slobodian I, Del Bigio MR. (2009) Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin. **Experimental Neurology**. 219: 187-196. Disponível em: < [doi:10.1016/j.expneurol.2009.05.015](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.015)>. Acesso em: 15 jan. 2019.

Luo J, Luo Y, Zeng H, Reis C, Chen S (2018) Research Advances of Germinal Matrix Hemorrhage: An Update Review. **Cellular and Molecular Neurobiology** 39:1-10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10571-018-0630-5>>. Acesso em: 01 abr. 2020.

Mishra PS, Dhull DK, Nalini A, Vijayalakshmi K, Sathyaprabha TN, Alladi PA, Raju TR (2016) Astroglia acquires a toxic neuroinflammatory role in response to the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. **Journal of Neuroinflammation** 13: 1-14.

Molinari F, Rimini D, Liboni W, Acharya UR, Franzini M, Pandilfi S, Ricevuti G, Vaiano F, Valdenassi L, Simonetti V (2017) Cerebrovascular pattern improved by ozone autohemotherapy: an entropy-based study on multiple sclerosis patients. **Medical & Biological Engineering & Computing** 55:1163-1175. Disponível em: <DOI 10.1007/s11517-016-1580-z>. Acesso em: 02 dez. 2018.

Morgan FW, Stewart JA, Smith AN, Tarnuzzer RW (2005) Differential expression of stress response genes in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. **Molecular Brain Research** 138:273 – 290.

Nigri F, Gobbi GN, Da Costa Ferreira Pinto PH, Simões EL, Caparelli-Daquer EM (2016) Hydrocephalus caused by unilateral foramen of Monro obstruction: A review on terminology. **Surgical Neurology International** 7: S307-13.

Núñez A, Benavente I, Blanco D, et al. (2018) Estrés oxidativo en la asfixia perinatal y la encefalopatía hipóxico-isquémica. **Anales de pediatría** 88:228.e1---228.e9.

Prada I (2014) Neuroanatomia funcional em medicina veterinária com correlações clínicas. Jaboticabal: Terra Molhada, 616p.

Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia** 50:427-434.

Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT (2005) Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. **FASEB J** 19: 76-8.

Oton-De Lima B (2014) **Comparação dos custos e benefícios do tratamento da hidrocefalia com implante de válvula e com cirurgia neuroendoscópica** 147f. Tese (Ciência da Saúde) - Faculdade de Ciência da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

Olopade FE, Shokunbi MT, Sirén AL (2012) The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. **Fluids Barriers CNS** 9:1-10.

Resitoglu B, Celik Y, Komur M, Polat A, Erdogan S, Arslankoylu AE, Beydagi H (2018) The efficacy of ozone therapy in neonatal rats with hypoxic ischemic brain injury. **Bratislava Medical Journal** 119: 81–85.

Reddy GK, Bollam P, Caldito G (2014) Long-Term Outcomes of Ventriculoperitoneal Shunt Surgery in Patients with Hydrocephalus. **World neurosurgery** 81: 404-410.

Sagai M, Bocci V (2011) Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? **Medical Gas Research** 1: 1-18. Disponível em: <<http://www.medicalgasresearch.com/content/1/1/29>>.

Santos MV, Lopes LS, Machado HR, Oliveira RS (2019) Behavioral and Biochemical Features of the Course and Surgical Treatment of Experimental Obstructive Hydrocephalus in Young Rats. **Developmental Neuroscience** 41:34-43. Disponível em: <DOI: 10.1159/000497433>. Acesso em: 20 mar. 2020.

Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu JV, Arendash GW (1999) Evidence That Oxidative Stress Is Associated with the Pathophysiology of Inherited Hydrocephalus in the H-Tx Rat Model. **Experimental Neurology** 155: 109–117.

Sofroniew M (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosciences** 32:638-647.

Toklu H, Yang Z, Oktay S, Sakarya Y, Kirichenko N, Matheny MK, Muller-Delp J, Strang K, Scarpace PJ, Wang KKW, Tümer N (2017) Overpressure blast injury-induced oxidative stress and neuroinflammation response in rat frontal cortex and cerebellum. **Behavioural Brain Research** 340:14-22. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.025>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

Turgut M, Baka M, Uyanikgil Y (2018) Melatonin Attenuates Histopathological Changes in the Hippocampus of Infantile Rats with Kaolin-Induced Hydrocephalus. **Pediatric Neurosurgery** 53: 229-237. Disponível em: <DOI: 10.1159/000488497>. Acesso em: 10 jan. 2019.

Xu H, Xu B, Wang ZX, Tan GW, Shen SH (2015) Inhibition of Wnt/ β -catenin signal is alleviated reactive gliosis in rats with hydrocephalus. **Childs Nervous System** 31: 227–234.

Zachari JF, McGavin MD (2013) **Bases da patologia em veterinária**. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Zhou N, Fu Z, Sun T (2008) Effects of different concentrations of oxygen – ozone on rats' astrocytes in vitro. **Neuroscience Letters** 441:178–182.

Zicarelli CAM, Georgeto SM, Fernandes KBP, Gariba MA, Dias CH, Aguiar LR (2014) Síndromes do corpo caloso. Revisão de literatura. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia** 2:121-126.

8- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora tenhamos observado uma redução considerável da reação astrogliar no corpo caloso e uma melhora no desempenho comportamental e clínicos dos animais tratados com ozonioterapia, outros estudos devem ser realizados para melhor elucidação sobre os efeitos da terapia com ozônio na matriz germinativa do rato neonato. Vale ressaltar que não houve redução da dilatação ventricular, e os mecanismos das lesões permaneceram ativos, sugerindo que pacientes hidrocefálicos possam ser tratados com derivação associada à ozonioterapia para uma terapêutica mais completa.

O presente estudo apresentou uma limitação ao não determinar o mecanismo exato pelo qual o ozônio exerceu sua atividade neuroprotetora no rato neonato hidrocefálico. No entanto, estudos anteriores sugerem que a terapia com ozônio exerça sua atividade neuroprotetora pela produção de enzimas antioxidantes e neuroendócrina, supressão da inflamação e liberação de fatores de crescimento. A carência de pesquisas relacionadas aos efeitos terapêuticos da ozonioterapia no SNC do neonato, em especial da matriz germinativa, culmina na relevância deste trabalho em aprimorar os estudos nesta área.